

**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS CON ESPECIALIZACIÓN EN
HISTOLOGÍA**

**“Identificación histológica, de *Batrachochytrium dendrobatidis*
(Chytridiomicete, Chytridiales) en piel de diferentes partes del cuerpo
de *Atelopus varius* (Amphibia, Anura, Bufonidae) colectadas muertas o
moribundas en el Copé, Panama, a finales del 2004 utilizando
Hematoxilina y Eosina”**

**POR
DRA. MARICELA URROZ GARCÍA**

**Trabajo de Graduación para optar al Título
de Maestría en Ciencias Biomédicas con
especialización en Histología.**

**Panamá, República de Panamá
2009**

**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS CON ESPECIALIZACIÓN EN
HISTOLOGÍA**

**“Identificación histológica, de *Batrachochytrium dendrobatidis*
(Chytridiomicete, Chytridiales) en piel de diferentes partes del cuerpo
de *Atelopus varius* (Amphibia, Anura, Bufonidae) colectadas muertas o
moribundas en el Copé, Panama, a finales del 2004 utilizando
Hematoxilina y Eosina”**

**POR
DRA. MARICELA URROZ GARCÍA**

Trabajo de Graduación para optar al Título
de Maestría en Ciencias Biomédicas con
especialización en Histología.

**Panamá, República de Panamá
2009**

APROBACIÓN

**Identificación histológica, de *Batrachochytrium dendrobatidis*
(Chytridiomicete, Chytridiales) en piel de diferentes partes del cuerpo
de *Atelopus varius* (Amphibia, Anura, Bufonidae) colectadas muertas o
moribundas en el Copé, Panama, a finales del 2004 utilizando
Hematoxilina y Eosina**

Presentada por

DRA MARICELA URROZ GARCÍA

Para optar por el grado de Maestría en Ciencias
Biomédicas con especialización en Histología.

JURADO CALIFICADOR

Mgter César Jaramillo
Director de Tesis

Dra. Nora de Moreno
Miembro del Jurado

Dra. Virginia Sánchez Pino
Miembro del Jurado

Fecha 31 de marzo de 2009

DEDICATORIA

- A la poblacion de anfibios de Panamá tan variada e importante que merece todo el trabajo necesario para lograr su protección y conservación
- A mi esposo y a mis hijos grandes amantes de la naturaleza

AGRADECIMIENTO

- Al equipo de trabajo de la investigadora Karen Lips que colectaron los especímenes utilizados para esta investigación
- A mi profesor Asesor Mgter César Jaramillo por su gran apoyo comprensión y paciencia demostrado a lo largo de la elaboración del presente trabajo
- A la Profesora María Valdés de Goti por el tiempo invertido en la revisión del manuscrito y por su interés por nuestro trabajo
- A la Licda. Denis Tapia, la Licda. Paula Aparicio y Lic Roberto Moreno por su valioso apoyo con las funciones especiales realizadas
- A la Administración de la Maestría por el apoyo e interés demostrado para que todos podamos concluir con esta meta.
- A mi familia y a todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron para lograr la presentación de esta investigación

Muchas Gracias ..

ÍNDICE GENERAL

Página de presentación	1
Aprobación de Tesis	II
Dedicatoria	III
Agradecimiento	IV
Indice General	v
Indice de Cuadros	IX
Índice de Figuras	x
Índice de Anexos	XII
Abreviaturas Utilizadas	XIII
Resumen	1
Abstrac	1
Introducción	2
CAPITULO I MARCO CONCEPTUAL	4
1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
2 ANTECEDENTES	5
3 JUSTIFICACIÓN	7
4 PROPÓSITO	9

5 OBJETIVOS GENERALES	9
6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
 CAPÍTULO II FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	 12
1 <i>Atelopus varius (rana arlequín)</i>	14
a) Filogenia	14
b) Características	15
c) Histología de la piel de anfibios	16
2 <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	19
a) Filogenia	19
b) Características	19
c) Quitridiomycosis	21
3 DEFINICIÓN CONCEPTUAL DE VARIABLES	23
4 HIPÓTESIS	25
 CAPÍTULO III ASPECTOS METODOLÓGICOS	 26
1 ÁREA DE ESTUDIO	27
2 TIPO DE ESTUDIO	27
3 UNIVERSO Y MUESTRA	28
4 MÉTODOS	28
TÉCNICAS HISTOLÓGICAS	28
Pasos de la técnica histológica	29

I- Obtención de la muestra	29
II Fijación	30
III- Tallado	32
IV- Procesamiento de Tejido	33
<i>1- Fijación</i>	34
<i>2- Deshidratación</i>	34
<i>3- Aclaramiento (desalcoholización)</i>	35
<i>4- Inclusión</i>	36
V- Bloqueo	36
VI Corte	38
VII- Tinción	40
1 Tinción de hematoxilina y eosina	42
LA HEMATOXILINA	43
LA EOSINA	45
Pasos de la Tinción de Hematoxilina y Eosina	46
2 Tinción de metenamina de plata (Grocott, Luna 1968)	47
SOLUCIONES	48
PROCEDIMIENTO	49
VIII- Montaje	50
 CAPÍTULO IV RESULTADOS	 52
 PRIMERA PARTE DE LA INVESTIGACION	 Valorar el uso de la Hematoxilina y Eosina para identificar adecuadamente al <i>Batrachochytrium</i>

<i>dendrobatidis</i> en cortes histológicos de piel del <i>Atelopus varius</i> colectados muertos o moribundos.	53
1 RECOLECCIÓN DE DATOS	53
a) Datos obtenidos	53
b) Interpretación de los datos	56
2 PROCESAMIENTO DE LOS DATOS	57
3 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	59
 SEGUNDA PARTE DE LA INVESTIGACIÓN Identificar las partes anatómicas del <i>Atelopus varius</i> colectados muertos o moribundos, donde se puede diagnosticar con mayor facilidad el <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> en cortes histológicos de piel	 61
1 RECOLECCIÓN DE DATOS	61
a) Datos obtenidos	61
b) Interpretación de los datos	63
2 PROCESAMIENTO DE LOS DATOS	64
a) Cálculo de Sensibilidad y Valor Predictivo de cada muestra estudiada	64
b) Estudio del grado de infección encontrada en las diferentes muestras	65
3 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	67
4 DISCUSIÓN	68
 CONCLUSIONES	 72
RECOMENDACIONES	76
BIBLIOGRAFÍA	78
ANEXOS	84

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	TITULO	Pág N°
N° I	IDENTIFICACIÓN DEL <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> CON HEMATOXILINA Y EOSINA Y METENAMINA DE PLATA EN PIEL DE DIFERENTES PARTES DEL CUERPO ESPECÍMENES DE <i>Atelopus varius</i>.	54
N° II	IDENTIFICACIÓN DEL GRADO DE INFECCIÓN DE <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> CON HEMATOXILINA Y EOSINA EN PIEL DE DIFERENTES PARTES DEL CUERPO DE <i>Atelopus varius</i>.	61
N° III	MUESTRA POSITIVAS Y NEGATIVAS TEÑIDAS CON HYE ENCONTRADAS EN PIEL DE LAS DIFERENTES PARTES DEL CUERPO DEL <i>Atelopus varius</i> EXAMINADAS	63
N° IV	FRECUENCIA DE MEJORES OBSERVACIONES DEL <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> EN PIEL OBSERVADAS CON HYE SEGUN LAS DIFERENTES PARTES DEL CUERPO DEL <i>Atelopus varius</i> EXAMINADAS, TOMANDO EN CUENTA LA INTEGRIDAD DEL TEJIDO Y EL GRADO DE INFECCIÓN ENCONTRADA.	66

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	Pág N°
N° 1	<i>Atelopus varius</i> . Coloración observada en El Copé	16
N° 2	Imagen observada al microscopio de luz de piel de <i>Atelopus varius</i> con la tinción de Hematoxilina y Eosina	18
N° 3	Esporangios del <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> observados en piel de <i>Atelopus varius</i> con la tinción de Hematoxilina y Eosina	22
N° 4	Partes anatómicas de donde se extrajeron las muestras de piel de <i>Atelopus varius</i> para el estudio histológico	24
N° 5	Especímenes de <i>Atelopus varius</i> de donde se obtuvieron las muestras histológicas de piel estudiadas	30
N° 6	Tallado e identificación de las muestras de piel de <i>Atelopus varius</i> para iniciar el procesamiento de los tejidos para el estudio histológico	33
N° 7	Procesador automático de tejidos utilizado en el presente estudio	34
N° 8	Confección de bloques de tejido en parafina utilizando una base de metal y un anillo de plástico	37
N° 9	Corte de los bloques de tejidos utilizando el micrótomos de rotación	39
N° 10	Juego de Tinción de Hematoxilina y Eosina	47

N° 11	Montaje de las placas histológicas para su posterior observación	51
N° 12	Imagen observada al microscopio de luz de los esporangios de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> teñidos con Hematoxilina y Eosina y con Metenamina de plata en piel de <i>Atelopus varius</i>.	56
N° 13	Frecuencia de mejores observaciones del <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> en piel observadas con HyE según las diferentes partes del cuerpo del <i>Atelopus varius</i> examinadas, tomando en cuenta la integridad del tejido y el grado de infección encontrada.	66

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO	TITULO	Pág N°
N° 1	<i>Problemas más comunes en el corte con micrótopo de rotación y sus posibles causas</i>	85
N° 2	<i>Fotos histológicas de algunos de los cortes de piel examinados con diferentes grados de infección diagnosticada</i>	86

ABREVIATURAS UTILIZADAS

- H y E** Hematoxilina y Eosina, tinción de rutina utilizada en preparaciones histológicas
- I** Segmento de piel obtenido de la ingle de cada uno de los especímenes estudiados
- A** Segmento de piel obtenido del abdomen de cada uno de los especímenes estudiados
- D** Segmento de piel obtenido del dorso de cada uno de los especímenes estudiados
- M** Segmento de piel obtenido de la región dorsal del muslo de cada uno de los especímenes estudiados
- V** Segmento de piel obtenido de la membrana entre T4 y T5 de cada uno de los especímenes estudiados
- T** Segmento de piel que reviste el corte transversal del IV dedo de la extremidad delatera de cada rana contado desde la línea media hacia afuera.
- T4** Cuarto dedo de extremidades traseras de las ranas contadas desde la línea media hacia afuera.
- T5** Quinto dedo de extremidades traseras de las ranas contadas desde la línea media hacia afuera

RESUMEN

En la actualidad hemos visto que una gran cantidad de ranas están desapareciendo relacionadas con la infección del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*. Es importante identificar este hongo con facilidad para tomar medidas para evitar la desaparición de especies de ranas por lo que en esta investigación estudiamos diferentes sitios anatómicos de *Atelopus varius* donde se pueda diagnosticar histológicamente la presencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* y además se hizo una comparación de técnicas tintoriales utilizando la tinción de uso rutinario en histología (Hematoxilina y Eosina) y una tinción específica para hongos (Metenamina de plata) para el diagnóstico histológico del *Batrachochytrium dendrobatidis* en muestras de piel de *Atelopus varius*.

Se calcula la sensibilidad, especificidad y valor predictivo y se demostró que la sensibilidad de la tinción de Hematoxilina y Eosina para identificar al *Batrachochytrium dendrobatidis* en cortes histológicos de piel de *Atelopus* es de 95.8 %

Tomando en cuenta aspectos como la integridad del epitelio, la presencia o no de los esporangios del hongo y el grado de infección encontrado en los segmentos de piel estudiados de cada espécimen, podemos determinar que la mejor muestra para diagnosticar la presencia del *Batrachochytrium dendrobatidis* en piel teñida con H y E fue la muestra obtenida de la membrana entre T4 y T5 de las patas traseras.

ABSTRACT

Today we have seen that a lot of frogs are disappearing related to infection of the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. It is important to identify this fungus with ease to take measures to prevent the disappearance of species of frogs. In this research study, different anatomical sites of *Atelopus varius* where the presence of *Batrachochytrium* can be diagnosed histologically, *dendrobatidis* and also made a comparison of technical tintoriales using routine use in histology (Hematoxylin and eosin) staining and a specific stain fungi (Methenamine silver) for the histologic diagnosis of the *Batrachochytrium dendrobatidis* samples of skin of *Atelopus varius*.

We calculated the sensitivity, specificity and predictive value and demonstrated the sensitivity of the stain Hematoxylin and eosin to identify the *Batrachochytrium dendrobatidis* in histological cuts. *Atelopus* skin is 95.8 %

Taking into account aspects such as the integrity of the epithelium, the presence or not of the sporangia of fungus and the degree of infection found in studied skin segments of each specimen, we can determine that the best sample to diagnose the presence of the *Batrachochytrium dendrobatidis* skin dyed with H and E was obtained from the membrane between T4 and T5 hind legs sample.

INTRODUCCIÓN

Desde finales de la década de 1980 se ha observado la disminución drástica de un gran número de poblaciones de anfibios en varios sitios de Norte Centro y Suramérica, Europa y Australia, estas disminuciones han afectado grupos enteros de anfibios tanto en áreas deforestadas e intervenidas como en zonas naturales. Las desapariciones son muy rápidas y repentinas y no pueden ser explicadas por la destrucción de los hábitats ya que también han ocurrido dentro de las áreas protegidas. Se piensa que estos procesos de extinción se deben a la acción de diversos agentes como la contaminación, la lluvia ácida, los residuos radiactivos procedentes de áreas industrializadas y la diseminación de organismos patógenos a través del aire, el agua o por la introducción accidental de sus vectores.

En los últimos años se ha asociado la disminución de poblaciones de anfibios a la presencia de un hongo del orden de los Chytridiales denominado *Batrachochytrium dendrobatidis*. Los Chytridiales se encuentran diseminados en todo el mundo hasta hace poco sólo se conocían como saprófitos, parásitos de plantas, algas, protistas e invertebrados pero la nueva especie *Batrachochytrium dendrobatidis* resulta letal para los anfibios provocando frecuentemente su muerte. Podría ser que el hongo siempre haya estado en contacto con los anfibios y que sólo recientemente los animales afectados se encuentren inmunodeprimidos y por tanto sean más vulnerables. Por otro lado la virulencia del hongo podría haber aumentado recientemente por algún cambio ambiental.

resultando letal para los anfibios. O pudiera ser que el hongo habría sido introducido recientemente en las zonas afectadas.

En Panamá el *Batrachochytrium dendrobatidis* se ha extendido desde la frontera con Costa Rica pasando por Fortuna, Santa Fe El Cope. Puede seguir avanzando hacia el este afectando otras poblaciones de ranas del género *Atelopus* como *A. zeteki* en el Valle de Antón, *A. limosus* en Chagres y Kuna Yala y *A. certus*, *A. glyphus* y *A. sp* en el Darién.

El género *Atelopus* es el más afectado en América por esta enfermedad y uno de los primeros signos de presencia del quitridiomycosis es la aparición de muchas ranas muertas o moribundas en las orillas de las quebradas, lo que es inusual en poblaciones sanas.

Es necesario recoger información suficiente sobre la extensión de la infección para poder plantear estrategias de conservación y manejo de la parasitosis a corto, mediano y largo plazo. La extensión de la infección se determina por la presencia del hongo en animales colectados de diferentes zonas geográficas. Hay diversos métodos para identificar el *Batrachochytrium dendrobatidis* como la determinación molecular del hongo y la demostración del hongo en los tejidos por métodos histológicos. Este método es más económico y de mayor facilidad.

Este trabajo de investigación se compone de dos partes. En la primera parte se evalúa si la tinción histológica de rutina (H y E) es eficiente en el diagnóstico del *Batrachochytrium dendrobatidis* en piel de *Atelopus varius* encontrados muertos o moribundos. En la segunda parte se pretende establecer qué partes anatómicas del *Atelopus varius* son las mejores para extraer muestras de piel para diagnosticar el *Batrachochytrium dendrobatidis* de animales encontrados muertos o moribundos.

CAPÍTULO I
MARCO CONCEPTUAL

CAPÍTULO I MARCO CONCEPTUAL

1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Esta es una investigación que trata de dar respuesta a dos problemas

¿Podemos utilizar la tinción histológica de rutina para identificar adecuadamente al *Batrachochytrium dendrobatidis* en cortes de piel del *Atelopus varius* encontrados muertos o moribundos?

¿Cuáles son las partes anatómicas donde se puede identificar con mayor facilidad el *Batrachochytrium dendrobatidis* en cortes histológicos de piel de *Atelopus varius* encontrados muertos o moribundos?

2 ANTECEDENTES

Las poblaciones de anfibios pueden presentar fluctuaciones normales a lo largo del tiempo sin embargo cuando el numero de individuos de una especie decrece considerablemente en un período de tiempo debemos tratar de encontrar las posibles causas de dicha disminución para poder prevenir en la medida de lo posible una extinción de dicha especie

En los ultimos años se ha podido detectar una reducción importante en la población de varias especies de anfibios en varias partes del mundo incluyendo a Panamá. Pounds y

colaboradores (1997) llevaron a cabo estudios basados en datos poblacionales de varios años y compararon sus resultados con el número de especies desaparecidas en Monteverde Costa Rica obteniendo como resultado que la reducción fue mucho más pronunciada de lo que el modelo predecía como normal

Luego de determinar que la disminución presentada en la población de varias especies de anfibios no es debida a una fluctuación normal se han realizado diferentes estudios tratando de encontrar la o las causas de dicha disminución Se han tomado en cuenta aspectos como los cambios climáticos y el efecto del aumento de los rayos ultravioleta (Pounds y Crump 1994 Pounds et al 1999 Blaustein et al 1994 Blaustein y Wake 1995 Pechmann y Wake 1997 Lips 1998 Lips 1999) sin embargo es muy probable que esta disminución en las poblaciones de anfibios esté determinada por varios factores que pueden alterar el estado inmunológico o que pueden producir mayor estrés en las especies haciéndolas más propensas al ataque de diferentes patógenos (Crump y Pounds 1985 Carey 1993 Pounds et al 1999) Entre estos patógenos pueden incluirse de manera importante los hongos

Longcore y colaboradores (1999) describen el *Batrachochytrium dendrobatidis* un nuevo Quitridiomycete patógeno en ranas Este hongo ha sido reportado en varias especies de anfibios en diferentes partes del mundo como Estados Unidos Australia, Nueva Zelanda, Ecuador Costa Rica y Panamá. El *Batrachochytrium dendrobatidis* se ha relacionado con la disminución de poblaciones de anfibios en Panama (Lips, 1999) y Costa Rica (Lips et al , 2003)

En Panamá se ha detectado una disminución importante en la población de ranas del género *Atelopus* y se ha documentado que esta disminución ha avanzado progresivamente

desde la frontera con Costa Rica y muy probablemente se propague por todo el país si no se toman las medidas necesarias para detenerla.

En Australia la chitridiomycosis se ha propagado aproximadamente 100 Km por año (Kirkpatrick and Aplin 2000 Aspeare 2000)

3 JUSTIFICACIÓN

Debemos preocuparnos por las poblaciones de anfibios debido a que la desaparición de las especies de anfibios puede traer serios efectos colaterales sobre los ecosistemas al debilitar los ciclos de transferencia de nutrientes. Además las repercusiones a nivel social podrían ser alarmantes ya que podría aumentar la incidencia de ciertas enfermedades para el hombre como la malaria, la fiebre amarilla, el dengue hemorrágico etc como consecuencia del aumento de las poblaciones de mosquitos e insectos.

De la misma forma, la ausencia de anfibios conllevaría a la pérdida de oportunidades para encontrar la cura de algunas enfermedades que están siendo combatidas con medicamentos producidos en base a los alcaloides, toxinas y demás exudados extraídos de la piel de estos animales.

Algunas de estas desapariciones se encuentran asociadas con una pandemia provocada por un hongo patógeno del filo Chytridiomycota, *Batrachochytrium dendrobatidis*, el cual ha sido aislado de la piel de las ranas. Las poblaciones de anfibios afectadas por esta especie de hongo generalmente desaparecen en pocos meses siguiendo el patrón de dispersión típico de las enfermedades infecciosas.

Las especies de anfibios más afectadas son las que tienen renacuajos acuáticos por ejemplo las ranas de los géneros *Atelopus* y *Colostethus* en las que se han encontrado grandes disminuciones en sus poblaciones

El *Atelopus varius* se encuentra en la Lista Roja de la UICN (IUCN) donde se colocan a las especies que enfrentan riesgo muy alto de extinción. Hay muchas poblaciones que se han extinguido en Costa Rica, algunas sobreviven en Panamá. La probabilidad de extinción en los próximos 10 años es mayor del 50%. Las declinaciones son rápidas (2-3 años) y casi la mitad de la fauna de anfibios es afectada simultáneamente.

El problema persiste y se han encontrado declinaciones rápidas asociadas al quitridio en Australia, México, España, Guatemala, Canadá, Honduras, California, Costa Rica, Colorado, Panamá, Nuevo México, Arizona, Illinois, Ecuador y Puerto Rico.

La gran mayoría de las veces cuando aparece la quitridiomycosis vamos a encontrar ranas muertas o moribundas a orillas de los ríos o quebradas. En estas circunstancias algunos tejidos se pueden haber lisado de manera que no permitan la identificación histológica del hongo. Por esta razón, es importante determinar qué partes anatómicas de los anuros permiten una adecuada identificación histológica del hongo en estas circunstancias. También es importante contar con métodos de diagnóstico sencillos y económicos que permitan determinar la presencia del hongo. Por lo que escogimos la tinción con Hematoxilina y eosina que es una tinción de rutina en histología y patología, es de fácil uso y tiene buen contraste y definición.

El departamento de Histología y Neuroanatomía Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Panamá ha prestado en los últimos años el servicio de diagnóstico

histológico del *Batrachochytrium dendrobatidis* a diversos científicos que estudian la disminución de anfibios en Panamá y cuenta con el equipo y condiciones necesarias para llevar a cabo la presente investigación

4 PROPÓSITO

Aportar información al personal especializado que esta realizando monitoreos de las poblaciones de anfibios en Panamá para que puedan identificar la presencia del *Batrachochytrium dendrobatidis* en forma fácil rápida, económica y eficientemente en ranas colectadas muertas o moribundas

La identificación histológica rápida y eficiente es de gran utilidad en el monitoreo del avance del hongo en Panamá, ya que se predice que en algunos años puede atacar a diferentes poblaciones de *Atelopus* localizadas en la parte este de nuestro país donde aun no se ha reportado la presencia d este patógeno

5 OBJETIVOS GENERALES

- 1 Valorar el uso de la Hematoxilina y Eosina para identificar adecuadamente al *Batrachochytrium dendrobatidis* en cortes histológicos de piel del *Atelopus varius* colectados muertos o moribundos.
- 2 Identificar las partes anatómicas del *Atelopus varius* colectados muertos o moribundos donde se puede diagnosticar con mayor facilidad el *Batrachochytrium dendrobatidis* en cortes histológicos de piel.

6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1

- 1 1 Realizar tinciones con Hematoxilina y Eosina en cortes histológicos de piel de *Atelopus varius* colectados muertos o moribundos para demostrar la presencia de *Batrachochytrium dendrobatidis*
- 1 2 Realizar tinciones con Metenamina de plata en cortes histológicos de piel de *Atelopus varius* colectados muertos o moribundos para demostrar la presencia de *Batrachochytrium dendrobatidis*
- 1 3 Comparar los resultados obtenidos con la tinción de rutina de Hematoxilina y Eosina y la tinción especial para hongos de Metenamina de plata.
- 1 4 Evaluar la sensibilidad, especificidad y valor predictivo de la Hematoxilina y Eosina para identificar el *Batrachochytrium dendrobatidis* en cortes histológicos de piel de *Atelopus varius* colectados muertos o moribundos

2

- 2 1 Identificar el *Batrachochytrium dendrobatidis* en cortes histológicos de piel de la región de la ingle de *Atelopus varius* colectados muertos o moribundos
- 2 2 Identificar el *Batrachochytrium dendrobatidis* en cortes histológicos de piel de la región del abdomen de *Atelopus varius* colectados muertos o moribundos
- 2 3 Identificar el *Batrachochytrium dendrobatidis* en cortes histológicos de piel de la parte posterior del muslo de *Atelopus varius* colectados muertos o moribundos
- 2 4 Identificar el *Batrachochytrium dendrobatidis* en cortes histológicos de piel del dorso de *Atelopus varius* colectados muertos o moribundos

- 2 5 Identificar el *Batrachochytrium dendrobatidis* en cortes histológicos de piel de la membrana interdigital entre los dedos del pie T4 y T5 de *Atelopus varius* colectados muertos o moribundos
- 2 6 Identificar el *Batrachochytrium dendrobatidis* en cortes histológicos de piel del IV dedo de las patas delanteras de *Atelopus varius* colectados muertos o moribundos
- 2 7 Comparar cantidad del *Batrachochytrium dendrobatidis* encontrado en cortes histológicos de las diferentes partes del cuerpo del *Atelopus varius* colectados muertos o moribundos

CAPÍTULO II
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

CAPÍTULO II FUNDAMENTACIÓN TEORICA

Los anfibios son uno de los grupos animales más amenazados del mundo en parte por presentar ciclos de vida complejos que incluyen una fase larvaria en agua y otra adulta en tierra, aunado al tipo de respiración la cual se da principalmente por la piel. Estas características aumentan la posibilidad de que sean afectados por contaminantes y otras sustancias en el agua o en el suelo o que se infecten con parásitos que entren al cuerpo por las branquias o por la piel. La alteración y destrucción de sus hábitats les está confinando a sobrevivir sólo en áreas reducidas que gozan de protección legal tales como Parques Nacionales.

Entre las posibles causas de las disminuciones no naturales de las poblaciones de anfibios están el calentamiento global que modifica la distribución y abundancia de las especies (Pounds et al 1999) la deforestación y fragmentación, radiación de rayos UV B el comercio la contaminación ambiental los cambios en los patrones de lluvias etc. Recientemente se registra la presencia de parásitos como virus bacterias y hongos (Berger et al 1998 Lips 1999) que producen algunas enfermedades emergentes propias de los anfibios. Estas enfermedades afectan a los anfibios también en zonas protegidas provocando extinciones masivas de poblaciones y especies en todo el mundo. Las enfermedades emergentes son enfermedades de reciente aparición, y se han incrementado

drásticamente en los últimos años. Aunque los virus son responsables de muchos episodios de mortalidad en masa de anfibios, los datos disponibles hasta el momento indican que ciertos hongos podrían ser una amenaza aun mayor para los anfibios provocando extinciones de poblaciones y especies en muchas partes del mundo.

Previo a las declinaciones repentinas pueden aparecer ranas muertas o agonizantes a lo largo de las quebradas acompañadas por deformidades en el aparato bucal de los renacuajos (Lips, 1999). Dos o tres años después sólo se encuentra la mitad de las especies de las comunidades de anfibios originales.

La quitridiomycosis se descubrió hace algunos años en Australia y Centroamérica, pero ya está distribuida por gran parte del mundo. Es causada por el *Batrachochytrium dendrobatidis*, un hongo de la clase Chytridiomycete, los cuales nunca antes habían sido registrados infectando a los vertebrados, pero que es bastante común en plantas e insectos. Esta enfermedad micótica aumenta el grosor de la piel (hiperqueratosis) en ciertas zonas del cuerpo (sobre el lado ventral del abdomen a nivel de los parches respiratorios o de intercambio acuoso) y sofoca al animal a la vez que libera toxinas que matan a los ejemplares contaminados.

1 *Atelopus varius* (rana arlequín)

a) Filogenia.

En el siguiente cuadro encontramos la filogenia del *Atelopus varius*.

CATEGORÍA	GRUPO	CARACTERÍSTICA
Reino	Animalia	Seres pluricelulares que se alimentan de forma heterótrofa (han de ingerir materia orgánica)
Filo	Chordata	Grupo de animales que al menos en estados embrionarios poseen un eje dorsal o corda
Subfilo	Vertebrata	Cordados que poseen una columna vertebral que protege el cordón nervioso dorsal
Clase	Amphibia	Vertebrados con mandíbulas fase larvaria de vida acuática y pulmones que se desarrollan después de la metamorfosis
Orden	Anura	Incluye sapos y ranas Algunos tienen metamorfosis complicada. Los adultos carecen de cola
Familia	Bufonidae	Sapos verdaderos
Género	<i>Atelopus</i>	Colores vistosos Distribuidas en Centro y Sur América
Especie	<i>Atelopus varius</i>	Muy variable en coloración, se encuentra en Costa Rica y Panamá

b) Características

Atelopus varius es un sapito sin glándulas parótidas visibles de coloración variada, predominantemente negras con manchas o barras de color verde lima, amarillo anaranjado o rojo es de forma rechoncha, piel lisa y ojos saltones con pupila horizontal

Tiene costumbres diurnas y terrestres los machos se encuentran sobre las piedras y orillas de las quebradas las hembras sólo van al agua para depositar los huevos Se reproducen en ríos y quebradas En Panamá las poblaciones del Copé Provincia de Coclé son conocidas como ‘ranas doradas’ porque en esta población su coloración es predominantemente amarilla con barras o manchas negras semejantes a la rana dorada del Valle de Antón

Se localizan en Costa Rica y Panamá, en Costa Rica las poblaciones están prácticamente extintas.

Sus hábitos alimenticios incluyen hormigas, isópodos, termitas, moscas pequeñas y otros insectos pequeños.

FIGURA N° 1

Atelopus varius. Coloración observada en El Copé.



c) Histología de la piel de anfibios:

La piel de los anfibios presenta tres capas: Epidermis, estrato fibroso y dermis. El estrato fibroso está formado por proteínas secretadas por las células epidérmicas y por los fibroblastos de la dermis. La orientación de las fibras en forma paralela está determinada por las células epidérmicas.

En el periodo embrionario los anfibios tienen epidermis constituida por un epitelio cilíndrico simple en las larvas se observa un epitelio biestratificado con células basales aplanadas con citoplasma denso y las células superficiales grandes claras con inclusiones envueltas en membranas con sustancias mucoides que se depositan en la superficie apical. Luego de la metamorfosis la epidermis se engruesa y los estratos superficiales se cornifican observándose las siguientes capas

- Células basales cilíndricas bajas con abundantes filamentos ribosomas y cisternas de retículo endoplasmático rugoso
- 4 a 5 estratos de células aplanadas que presentan granulos electrodensos que descargan su contenido de mucina en el espacio intercelular los glicoconjugados (equivalentes al glucocalix) son importantes en el reconocimiento celular adhesión celular interacciones con bacterias y posiblemente en el transporte de agua.
- Células apicales cornificadas

La epidermis tiene espacios intercelulares relativamente amplios a los que se les atribuye un papel importante en los procesos de transporte estos espacios están cerrados en la parte apical mediante zonula occludens

En la piel de los anfibios podemos encontrar glándulas alveolares y tubulares que se hacen funcionales poco antes de la metamorfosis y están rodeadas por fibras musculares lisas. Las glándulas alveolares son más abundantes y se dividen en mucosas y granulosa. Las mucosas producen una secreción incolora basofílica que se presenta en inclusiones homogéneas mientras que las granulosa producen una secreción lechosa acidofílica electrodensa que contiene triptamina y adrenalina, y posee acción irritante sobre

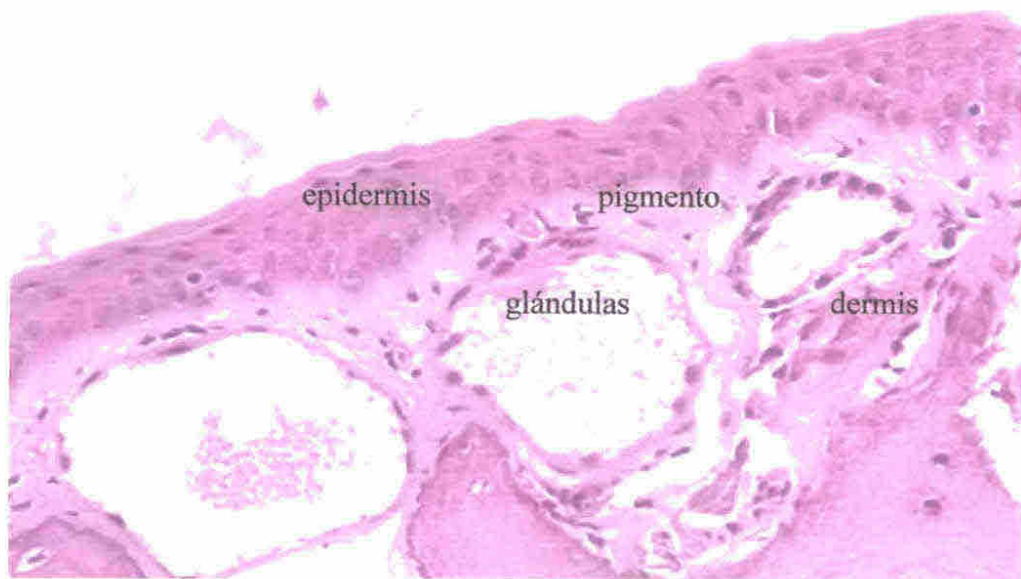
las mucosas de otros vertebrados. Las glándulas tubulares que se derivan de las mucosas son poco frecuentes y tienen una distribución específica.

La piel en los anfibios tiene gran importancia debido a las funciones de protección, intercambio gaseoso, movimiento de agua y de electrolitos que desempeña.

En la epidermis de anfibios hay a menudo cromatóforos. En la dermis encontramos pigmentos celulares como Iridophore y xanthophore.

FIGURA N° 2

Imagen observada al microscopio de luz de piel de *Atelopus varius* con la tinción de Hematoxilina y Eosina.



2 *Batrachochytrium dendrobatidis*

a) Filogenia

Filogenéticamente pertenece a

CATEGORÍA	GRUPO	CARACTERÍSTICA
Reino	Fungae	
Filo	Eumycota	Hongos verdaderos con pared
Subfilo	Mastigomycotina	Producen esporas asexuales flageladas (zoosporas)
Clase	Chytridiomycete	Cadenas celulares adheridas al tejido por medio de rizoides que terminan en punta. Las zoosporas tienen un solo flagelo posterior
Orden	Chytridales	
Género	<i>Batrachochytrium</i>	
Especie	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	Producen quitridiomycosis en anfibios

b) Características

A principios de 1999 se describe un nuevo hongo Chytridiomycete el cual es un patógeno de ranas y es asignado a un nuevo género *Batrachochytrium* (Longcore *et al* 1999) Los Chytridiomycete están conformados por cerca de 100 géneros y más de 1000 especies la mayoría de éstas saprófitas (Barr 1990) Entre sus hospederos se encuentran plantas vasculares fitoplancton, musgos nemátodos mosquitos escarabajos y otros hongos (Powell 1993) Son unicelulares y forman cadenas celulares adheridas al medio mediante rizoides presentan una pared de quitina y glucanos se reproducen

asexualmente por medio de zoosporas que se forman por segmentación citoplasmática dentro de un esporangio (Deacon, 1990) Algunas especies han sido descritas como vectores de virus que causan enfermedades de importancia económica (Teakle 1983) La mayoría de las especies cumplen con su ciclo de vida en unos pocos días y por lo general no son difíciles de aislar en un medio de cultivo si se utiliza el medio correcto (Alexopoulos *et al* 1996)

La mayoría de las especies de esta clase son saprófitos y viven libremente en agua y suelos *B dendrobatidis* puede tener una fase saprófita (Longcore *et al* 1999) *B dendrobatidis* es la primera especie que se conoce como parásita de algún vertebrado (Longcore *et al* 1999 Powell 1993) Fue aislado cultivado y descrito por Longcore en 1999 de un ejemplar de *Dendrobates azureus* a quien le debe su nombre

El *Batrachochytrium dendrobatidis* está catalogado como una de las 100 especies exóticas invasoras más dañinas del mundo según un informe de la Comisión de Supervivencia de especies publicado por ISSG (Invasive Species Specialist group) CSE (Comisión de Supervivencia de especies) de la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) (Lowe 2004)

Actualmente se ha diagnosticado al *Batrachochytrium dendrobatidis* en dos órdenes (Anura y Caudata) 14 familias y 93 especies

Según Longcore *et al* (1999) *B dendrobatidis* crece sobre la queratina de la epidermis de los anfibios sin embargo en los renacuajos el efecto parece ser menor ya que aun no han desarrollado la queratina postmetamórfica Sin embargo Lips (1999) encontró un 12 % de larvas de hílidos con las estructuras bucales deformadas en el occidente de Panamá. Se supone que el mayor efecto de la quitridiomycosis ocurre unas

pocas semanas después de la metamorfosis cuando se inicia la formación de la queratina epidermal (Warburg *et al* 1994 Berger *et al* 1999)

El *Batrachochytrium dendrobatidis* se puede presentar en dos formas esporangios esféricos de 10 – 40 μm de diametro o en forma de zoosporas móviles de aproximadamente 2 μm de diámetro Las zoósporas pueden vivir un poco mas de un dia en el agua (Berger *et al* 1999) por lo que es factible el contagio en ríos o lagunas infectadas

c) Quitridiomycosis

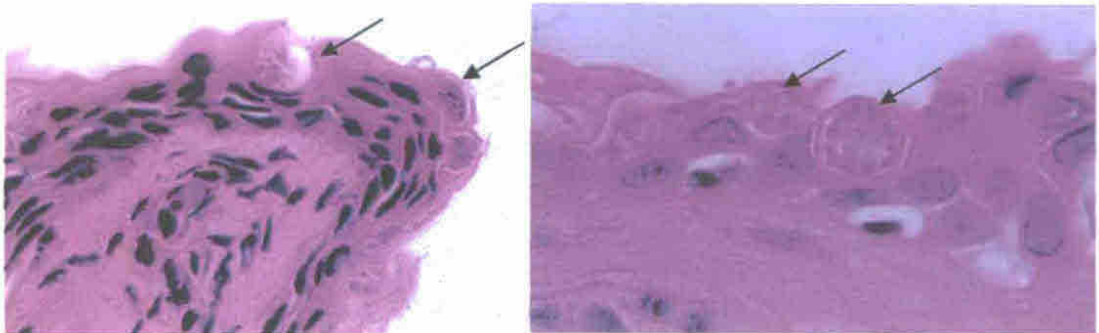
La enfermedad causada por el *Batrachochytrium dendrobatidis* es llamada **quitridiomycosis**

En la piel de ranas infectadas encontramos típicamente zoosporas en las capas superficiales del epitelio las capas de células justo por debajo de la superficie epitelial desaparecen dejando espacios que contienen zoosporas y detritos celulares El hongo se compone de rizoides en forma de fibras que crecen desde la capa exterior de la piel del individuo infectado cada segmento del tallo forma un esporangio dentro de los cuales se desarrollan las zoosporas que son las encargadas de la dispersión o diseminación. Los esporangios no tienen opérculo y la liberación de las zoosporas se produce desarrollando un tubo de descarga que perfora la piel del animal infectado Cuando las zoosporas (esporas móviles mediante flagelos) entran en contacto con los anfibios se fijan en la queratina de la piel a los pocos días desarrollan esporangios maduros que generan nuevas zoosporas La enfermedad se desarrolla exclusivamente en la capa superficial de

la piel y no afecta los órganos internos. Los cambios neurológicos pueden ser causados por absorción de toxinas secretadas por el *Batrachochytrium dendrobatidis* pero los mecanismos aún no se han determinado.

FIGURA N° 3

Esporangios del *Batrachochytrium dendrobatidis* observados en la piel de *Atelopus varius* con la tinción de Hematoxilina y Eosina.



Los signos típicos de la enfermedad se relacionan con el sistema nervioso central y la piel. Los signos neurológicos incluyen conducta anormal, letargo, inapetencia, los signos de la piel son decoloración, descamación de las capas superficiales cuya intensidad puede variar marcadamente de especimen a especimen.

La enfermedad afecta más a los adultos por tener toda la piel queratinizada mientras que los renacuajos quedan infectados sólo en la zona bucal, y mueren cuando completan la metamorfosis al extenderse la queratina. (Lipss,1999).

La causa final de la muerte de los animales infectados aún no se conoce con seguridad. Uno de los signos de la infección consiste en un engrosamiento del estrato

córneo dos a tres veces más de lo normal Berger et al (1998) sugieren que el quitridio causa la muerte por la hiperplasia de la epidermis que puede afectar la respiración cutánea y la osmoregulación La muerte puede ocurrir en 12 o más horas aunque puede ser repentina en algunas ranas con minimos signos clínicos

Por la semejanza genética del hongo en diferentes partes del mundo podría ser que el hombre sea el responsable de su dispersión Una hipótesis que aun no se ha comprobado pero que parece ser concordante con los datos actuales es que el hongo proviene de Africa y que fue transportado a Suramérica por medio de la rana *Xenopus sp* la cual era utilizada con fines de diagnóstico médico

3 DEFINICIÓN CONCEPTUAL DE VARIABLES

Piel de la region de la ingle de *Atelopus varius* Segmento de piel de la parte ventral en la unión del muslo con el abdomen

Piel de la región del abdomen de *Atelopus varius* segmento de piel de la porción central del abdomen del individuo

Piel de la parte posterior del muslo de *Atelopus varius* segmento de piel de la porción central del muslo en la cara dorsal

Piel del dorso de *Atelopus varius* segmento de piel de la porción central del dorso del individuo

Piel del IV dedo de *Atelopus varius* Corte transversal del IV dedo (dedo más lateral de las patas delanteras del animal)

Piel de la membrana interdigital entre los dedos T4 y T5 de *Atelopus varius*:

segmento de piel que comprende la membrana entre los dedos T4 y T5 de la pata trasera del animal.

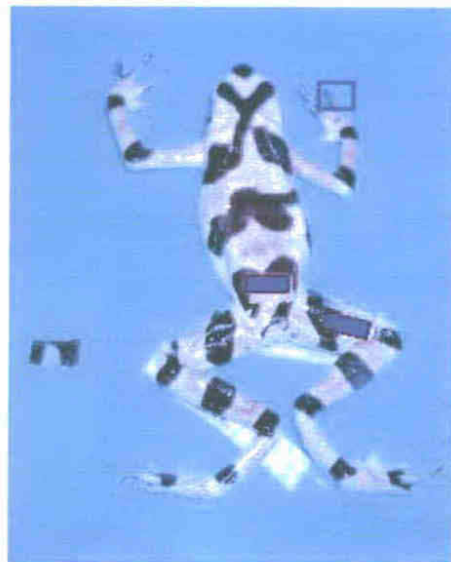
Batrachochytrium dendrobatidis: Hongo quitridiomicete, recientemente aislado, que infecta la piel de las ranas produciendo quitridiomicosis y que puede ser diagnosticado por técnicas histológicas.

Tinción de metenamina de plata: Tinción especial utilizada en patología para demostrar hongos en cortes de tejidos.

Tinción de Hematoxilina y eosina: Tinción de rutina utilizada en histología y patología.

FIGURA N° 4

Partes anatómicas de donde se extrajeron las muestras de piel de *Atelopus varius* para el estudio histológico.



4 HIPÓTESIS

La presente investigación se divide en dos partes y por lo tanto tenemos dos hipótesis

H1 La Hematoxilina y Eosina es una tinción útil para la identificación del *Batrachochytrium dendrobatidis* en cortes histológicos de piel de *Atelopus varius* colectados muertos o moribundos.

H2 La región abdominal es el mejor sitio anatómico para demostrar la presencia del *Batrachochytrium dendrobatidis* en cortes histológicos de piel del *Atelopus varius* colectados muertos o moribundos

CAPÍTULO III
ASPECTOS METODOLÓGICOS

ASPETOS METODOLÓGICOS

1 ÁREA DE ESTUDIO

El estudio se realiza en el campo de histología y se llevará a cabo en el Departamento de Histología y Neuroanatomía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Panamá.

2 TIPO DE ESTUDIO

Este trabajo está compuesto de dos partes la primera parte es un estudio analítico de comparación de pruebas diagnósticas en donde compararemos una tinción de uso rutinario en histología (Hematoxilina y Eosina) con una tinción específica para hongos (Metenamina de plata) para el diagnóstico histológico del *Batrachochytrium dendrobatidis* en muestras de piel de *Atelopus varius*. La prueba “oro” utilizada en este estudio es la de Metenamina de plata ya que es una prueba específica para detectar hongos en tejidos.

En la segunda parte comparamos la sensibilidad, especificidad y valor predictivo de la utilización de piel de diferentes partes anatómicas del *Atelopus varius* encontrados

muertos y moribundos para el diagnóstico histológico del *Batrachochytrium dendrobatidis*

3 UNIVERSO Y MUESTRA

El Universo está constituido por todos los especímenes de *Atelopus varius* colectados muertos o moribundos en el Parque Nacional General de Brigada Omar Torrijos en El Copé provincia de Coclé Republica de Panamá durante los últimos meses del 2004 (total 29 *Atelopus varius*)

4 MÉTODOS

TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

Se denomina Técnica Histológica al conjunto de procedimientos que se deben realizar para obtener preparaciones de tejidos u órganos para que puedan ser observables al microscopio. Estas preparaciones histológicas también reciben el nombre de placas o laminillas histológicas.

La técnica histológica permite conservar y observar los componentes celulares y tisulares lo más parecido a su estado natural. Uno de los pasos de la técnica histológica es la tinción, la cual nos da suficiente contraste para distinguir los diversos componentes tisulares y celulares.

Las técnicas histológicas se clasifican en directas e indirectas según el tipo de muestra que se utiliza. En nuestro estudio utilizamos Técnicas histológicas indirectas ya que las muestras de tejido fueron extraídas de individuos muertos (post mortem)

Pasos de la técnica histológica

I Obtención de la muestra

La muestra requerida debe ser extirpada y manejada con mucho cuidado ya que los tejidos frescos son muy frágiles y la morfología puede alterarse por un mal manejo de la muestra. Una vez extraída la muestra, ésta debe ser *rotulada o etiquetada*. El código (numero o nombre) debe acompañar a la muestra durante todo el proceso histológico para llevar un control preciso de todas las muestras procesadas

Las muestras en este estudio son los especímenes colectadas a finales de 2004 en el Copé. En la figura N° 5 podemos observar algunas de los especímenes utilizados en el estudio

FIGURA N° 5

Especímenes de *Atelopus varius* de donde se obtuvieron las muestras histológicas de piel estudiadas.

**II- Fijación**

Es el tratamiento que se le da al material histológico, con el propósito de mantener la forma y estructura de los constituyentes del tejido para que su estructura pueda ser examinada en sus mejores detalles, con un mínimo de alteración de su estado normal. Una adecuada y completa fijación, es fundamental para obtener preparaciones histológicas de calidad que permitan hacer una observación adecuada. El tejido debe ser fijado lo más rápidamente posible después de haber sido removido del cuerpo debido a que el proceso de autólisis comienza en el momento que ocurre la detención del flujo sanguíneo.

Para la fijación se utiliza un agente denominado fijador. Un buen fijador es aquel que cambia lo menos posible la química celular y a la vez preserva la estructura lo mejor posible.

Entre las funciones de un fijador están las siguientes:

Preservar los tejidos para que permanezcan, lo más parecido a su morfología en vida, manteniendo sus características microanatómicas. Sin alterar la afinidad a las tinciones por parte de las diferentes estructuras celulares.

Prevenir la autólisis celular, el cambio en el volumen del tejido durante cualquier fase del proceso, la distorsión o disolución de componentes celulares, las alteraciones químicas del tejido, la desecación del tejido al estar expuesto al ambiente, la invasión de saprófitos (como bacterias) y crecimiento de moho.

Permitir la manipulación del tejido en los pasos siguientes de la técnica histológica.

Para lograr una buena fijación es necesario tener en cuenta diferentes aspectos como el grosor y el tamaño del espécimen, el volumen de fijador necesario y la tasa de penetración del fijador, la temperatura de la solución fijadora, el tiempo que debe permanecer el tejido en el fijador. El tiempo de fijación varía de acuerdo al grosor y tamaño del espécimen.

El fijador de rutina en los laboratorios de histología y patología es la solución de formalina buffer neutral que está compuesta de la siguiente forma:

37 40% formalina.	100 0 ml
Agua destilada.	900 0 ml
Fosfato de sodio monobásico	4 0 gm

Fosfato de sodio dibásico (anhidro) 6.5 gm

Formaldehído al 40% (40 gramos en 100 ml de solución) es una solución del gas de formaldehído en agua. Esta solución es tratada como 100% cuando se quiere preparar formaldehído en otra concentración.

Las soluciones de formalina actúan como buenas fijadoras ya que penetran rápidamente aproximadamente 2.5 mm en 4 horas y no produce sobre fijación. El formaldehído no precipita proteínas y solo precipita débilmente los otros constituyentes de las células. Reacciona rápidamente con varios grupos funcionales de macromoléculas biológicas en enlaces cruzados fuertes con proteínas, glicoproteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos. Además forma compuestos metílicos con grupos aminos, amidas e hidroxilos y afecta la solubilidad y reactividad de proteínas.

Existen diferentes ejemplos de soluciones de formaldehído usados como fijadores: Solución salina de Formaldehído, Formalina Buffer neutra, Formalina al 10%, Formalina alcohólica, Formol Calcio, Formalina Acetato de sodio, Formalina Alcohol Ácido acético (FAA), Fenol Formalina Buffer neutra, Fenolformaldehído, Formaldehído Buffer sublimado (ácido mercurico), Líquido de Rossman's (ácido pícrico + etanol), Bouin's (ácido pícrico + ácido acético), Orth's.

En nuestro trabajo utilizamos formalina al 10%. Los *Atelopus* desde que fueron colectados se colocaron en formalina al 10%.

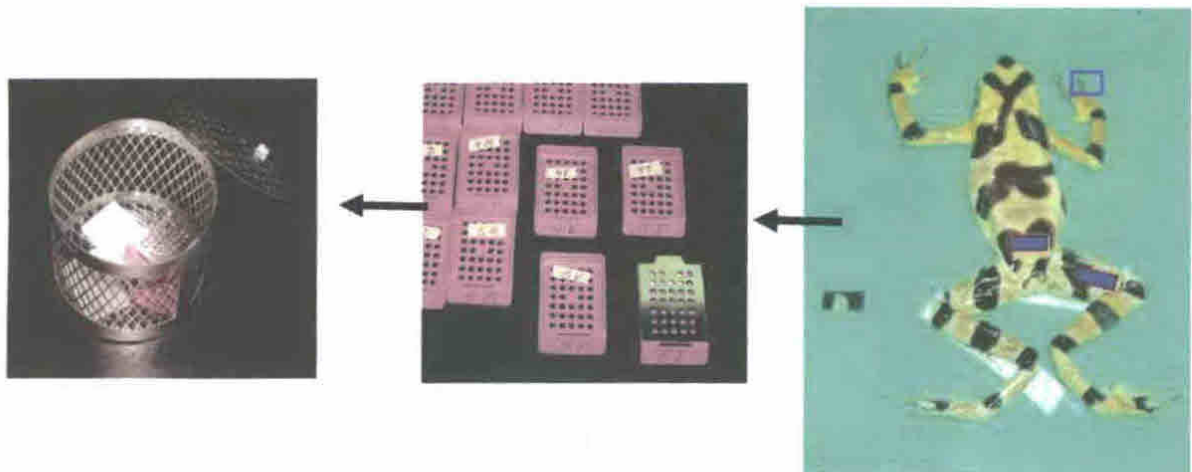
III- Tallado

Los especímenes deben ser cortados o tallados de manera que el fijador y los reactivos del procesamiento penetren el tejido en un tiempo razonable. Las muestras no deben exceder de 2.5 a 3 cm de ancho y de 3 mm de grosor.

En esta investigación se extrajeron fragmentos de piel de cada una de las partes anatómicas en estudio (ingle, abdomen, dorso, región dorsal del muslo, piel del IV dedo y de la membrana entre T4 y T5) de todos los individuos de *Atelopus varius* colectados. Las muestras son identificadas por un código compuesto por un número que corresponde al número del individuo (1 al 29) y una letra que corresponde al sitio del cuerpo de donde se obtuvo la muestra (I: ingle, A: abdomen, D: dorso, M: región dorsal del muslo, T: piel del IV dedo de las patas delanteras y V: piel de la membrana entre T4 y T5).

FIGURA N° 6

Tallado e identificación de las muestras de piel de *Atelopus varius* para iniciar el procesamiento de los tejidos para el estudio histológico.



IV- Procesamiento de Tejido:

El procesamiento de los tejidos se puede realizar de forma manual o mecánica mediante la utilización de un procesador automático de tejidos. En este estudio utilizaremos un procesador automático de tejidos Tissue-Tek II, modelo 4640-B

razón debemos remover el fijador y el agua de la muestra y reemplazarlos por el agente deshidratante

Los agentes deshidratantes son numerosos generalmente son alcoholes de varios tipos Algunos deshidratan por ser hidrofílicos y extraer agua del tejido Los agentes deshidratantes además incrementan la firmeza del tejido lo cual es beneficioso para poder realizar los cortes

El agente deshidratante más utilizado es el etanol en grado creciente de concentración 50% → 70% → 95% → etanol absoluto o butanol De esta forma los fluidos acuosos del tejido son removidos lentamente pero sin dañar la estructura del tejido

3- Aclaramiento (desalcoholización)

Permite el reemplazo del alcohol de los espacios intra y extracelulares del tejido por un líquido que se disuelva en parafina ya que la parafina no es soluble en los alcoholes

Los fluidos que son miscibles tanto con los agentes deshidratantes como con la parafina, son generalmente solventes hidrocarbonados y la mayoría de ellos tienen un índice de refracción similar al de las proteínas

Cuando los agentes deshidratantes son removidos y reemplazados por la mayoría de los agentes aclarantes los tejidos toman una apariencia translúcida por lo que se les denominó agentes aclarantes

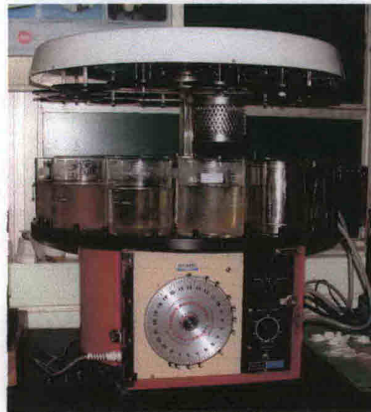
Entre los agentes aclarantes están

- Xilol o xileno Es generalmente el más utilizado en la mayoría de los programas de rutina que duran menos de 24 horas y donde las

que se observa en la Figura N° 7 y que se programó especialmente para realizar los pasos de la técnica histológica.

FIGURA N° 7

Procesador automático de tejidos utilizado en el presente estudio.



1- Fijación

Una adecuada y completa fijación, es fundamental para obtener preparaciones histológicas de calidad que permitan hacer una observación adecuada. El fijador de rutina en los laboratorios de histología y patología es la solución de formalina al 10%. Se colocan todas las muestras identificadas obtenidas del tallado en diferentes envases especiales y se inicia el procesamiento del tejido.

2- Deshidratación

Para poder hacer los cortes histológicos en los tejidos, hay que incluir las muestras en un medio que le de firmeza como la parafina. La parafina no es soluble en agua y la mayoría de los fijadores son acuosos, además los tejidos contienen grandes cantidades de agua en los espacios intra y extracelulares; por tal

muestras no son más gruesas que 5 mm Es un excelente agente aclarante aunque hace los tejidos duros y quebradizos por lo que no deben dejarse en esta sustancia más de tres horas

- Benceno
- Tolueno
- Aceite de Cedro
- Cloroformo etc

4- Inclusión

La inclusión es el proceso mediante el cual se impregnan los tejidos con un medio que llene todas la cavidades naturales espacios e intersticios tisulares y los espacios intracelulares proporcionándole la consistencia firme necesaria para hacer los cortes histológicos sin provocar distorsión y sin alterar las relaciones espaciales del tejido y los elementos celulares

El medio de inclusión más popular es la parafina sintética (paraplast) ya que es barata y fácil de manejar Se puede conseguir en un amplio rango de puntos de fusión (40 70 °C) lo que es ventajoso en diferentes regiones climáticas del mundo Parafinas con punto de fusión entre 54-58°C son satisfactorias en el procesamiento de rutina

Otros agentes de inclusión son Resinas, agar gelatina, celloidina y carbowax

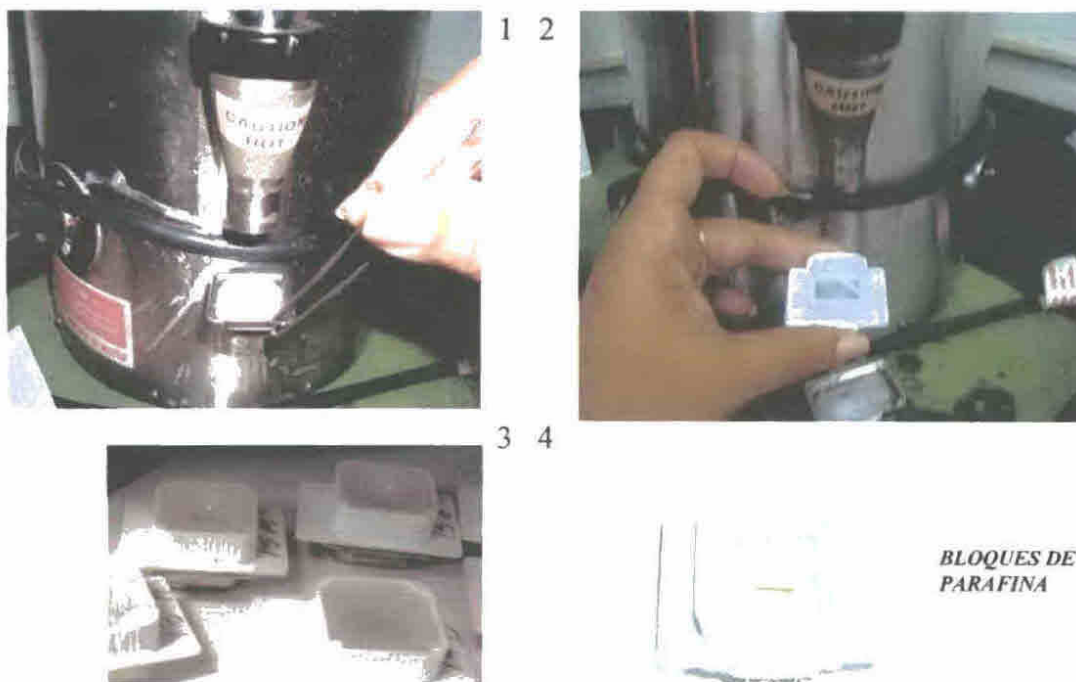
V- Bloqueo

El bloqueo es la confección de un molde o bloque de parafina utilizando una base de metal y un anillo plástico Se colocan cada una de las muestras obtenidas del procesador

de tejido en una base de metal y se agrega parafina a su temperatura de fusión, se deja enfriar obteniendo el bloque con el tejido que posteriormente va a ser utilizado para el corte histológico, ver figura N° 8.. En esta investigación obtendremos 6 bloques por cada individuo estudiado, en total, 174 bloques.

FIGURA N° 8

Confección de bloques de tejido en parafina utilizando una base de metal y un anillo de plástico



VI- Corte

El corte histológico se realiza utilizando un instrumento denominado micrótopo. Hay diferentes tipos de micrótopos en nuestro estudio utilizamos un micrótopo de rotación que es el más comunmente empleado en las técnicas histológicas de rutina.

Con el micrótopo de rotación o micrótopo tipo Minot se pueden obtener cortes a partir de 3µm de grosor. Es el más popular para cortes en parafina, sirve para cortar tejidos relativamente duros.

El micrótopo utiliza una cuchilla especial. Hay diferentes tipos de cuchilla, pero en el presente trabajo utilizamos una cuchilla en forma de cuña que son las más comunes y versátiles y son ampliamente recomendadas por la mayoría de los histotecnólogos. Estas cuchillas se pueden afilar de manera manual o automática. Las cuchillas pueden ser de diferentes materiales como el acero aunque actualmente se están utilizando mucho las cuchillas desechables que tienen un menor costo.

En este trabajo utilizamos un micrótopo de rotación Microm HM 310 en donde se coloca el bloque de parafina que se confecciono en el paso anterior y se hacen movimientos de rotación que acercan el bloque del tejido a una cuchilla especial que permite hacer cortes entre 3 y 5 micras. Obtendremos un mínimo de 2 placas histológicas por cada corte de piel las cuales serán teñidas con cada una de las tinciones en estudio.

Para realizar buenos cortes histológicos con el micrótopo debemos tomar en cuenta aspectos como los siguientes:

- El ángulo entre el bloque y la cuchilla debe estar entre 5 y 10 °
- El borde inferior y superior del bloque deben estar paralelos a la cuchilla.

- La porción más dura del tejido debe colocarse en la parte superior del bloque.
- Debe haber un margen prudente de parafina en el borde superior e inferior del bloque.
- Los bloques deben colocarse sobre hielo antes de cortar para mantener la parafina lo suficientemente consistente para poder realizar los cortes. A veces es necesario enfriar la cuchilla con un trozo de hielo.
- Se deben usar pinces de punta delgada para manipular los cortes.

FIGURA N° 9

Corte de los bloques de tejidos utilizando el micrótopo de rotación.



Una vez que se han realizado los cortes, se extienden las secciones en un baño de flotación entre 45 – 50 °C y posteriormente se recogen con un portaobjetos impregnado con albúmina de Mayer cuya función es adherir el tejido al portaobjetos. Existen otros tipos de adhesivos como la gelatina, Poli-L-Lisina y Aminopropiltietoxisilano.

Secado de los cortes

Pequeñas cantidades de agua quedan bajo el tejido luego de ser extraídos del baño de flotación y debe ser eliminada mediante calor para ello se utiliza un horno a la temperatura del punto de fusión de la parafina por 30 minutos. Es importante que no se sobrecaliente el tejido para evitar distorsión del mismo.

En este momento ya tenemos las laminillas o placas histológicas con el tejido listas para pasar al siguiente paso que es la tinción.

VII Tinción

Las laminillas obtenidas hasta el momento se pueden observar al microscopio pero no veremos mayores detalles ni contraste alguno para poder hacer una mejor observación al microscopio se hacen diferentes tinciones con colorantes que tiñen partes específicas de los tejidos y nos permiten diferenciar fácilmente sus componentes.

La mayoría de los colorantes que se utilizan en histología son sales neutras que se comportan como ácidos o como bases y tienden a formar sales insolubles con los radicales presentes en los tejidos. Los mecanismos de afinidad entre el tejido y el colorante son complejos y a veces no actúa un solo factor sino varios factores combinados. Entre estos factores se encuentran:

- ✱ Interacciones Solvente-Solvente enlaces hidrofóbicos
- ✱ Interacciones Reactivo-Reactivo
- ✱ Interacciones Reactivos Tejidos fuerzas de Van der Waal's
- ✱ Atracciones Columbicas

- ✱ Puentes de Hidrógeno

- ✱ Enlaces Covalentes

En las tinciones se utilizan diferentes soluciones la solución utilizada para tefir es llamada Solución de Trabajo Para que un colorante sea usado como Solución de Trabajo debe ser estable y tener a una concentración adecuada y a veces a un pH específico La Solución de Trabajo se obtiene mezclando un buffer u otro solvente con una solución que contiene más concentración de colorante que la Solución de Trabajo la cual se conoce como Solución Stock o Solución de Reserva o solución madre

Los colorantes utilizados en histología se pueden clasificar de diferentes formas

- 1 Segun el origen del colorante

- ✱ Naturales (Hematoxilina y Carmín)

- ✱ Sintéticos (Eosina)

- 2 Segun las propiedades fisicoquímicas del colorante

- ✱ Fluorescentes (Acridina naranja)

- ✱ Metacromáticos (Azul de toluidina)

- ✱ Leuco (Azul de metileno)

- ✱ Neutral (Eosina Azurófila)

- 3 Segun alguna clase de descripción de la estructura del colorante

- ✱ Complejo metálico (complejos aluminicos de la hemateína)

- ✱ Azo (Eosina)

- ✱ Xantenos (Pyronina Y)

- 4 Segun su uso en tinciones biológicas

- ✱ Vitales (Verde Janus)

- * Grasos (Oil Red)

- * Mucinas (Azul Alciano)

5 Segun su uso en la industria textil

- * Acidos (Eosina)

- * Básicos (Safranina)

6 Segun el supuesto modo de acción del colorante

- * Mordiente (Alumbre crómico de gallocyanina)

- * Reactivo (Mercurio naranja)

En el presente trabajo de investigación utilizamos 2 tinciones diferentes una tinción de rutina utilizada en histología, la HEMATOXILINA Y EOSINA (H y E) una tinción especial para la detección de hongos en tejidos la TINCIÓN DE METENAMINA DE PLATA

1 Tinción de hematoxilina y eosina

Es probablemente la tinción más ampliamente utilizada en histología y patología debido a que es una tinción simple y mediante ella podemos demostrar claramente un gran numero de estructuras tisulares

En esta investigación queremos evaluar la sensibilidad, especificidad y valor predictivo de la Hematoxilina y Eosina para identificar el *Batrachochytrium dendrobatidis* en cortes histologicos ya que es una tinción que se puede realizar en cualquier laboratorio de histología y que no tiene mayor grado de dificultad.

LA HEMATOXILINA

La **Hematoxilina** puede ser preparada en numerosas vías y aplicable a una amplia gama de tejidos tiñe el núcleo de las células de color morado a negro brindando una buena definición de detalles intranucleares

Es extraída del tronco del árbol *Haematoxylum campechianum* con agua caliente y precipitada de la solución acuosa usando urea. La Hematoxilina por sí misma no es un colorante realmente el producto de su oxidación llamado *Hemateína* es el verdadero colorante

La Hemateína puede ser obtenida por oxidación natural (proceso denominado maduración) o por oxidación química. La oxidación natural ocurre por la exposición a la luz y al aire es un proceso lento (3 a 4 meses) sin embargo la solución resultante de la oxidación natural retiene su habilidad tintorial por largo periodo de tiempo. La oxidación Química se logra usando productos químicos como el Iodato de Sodio (Hematoxilina de Mayer) Óxido de Mercurio (Hematoxilina de Harris). La oxidación química es prácticamente instantánea y permite utilizar el colorante inmediatamente después de la preparación pero su periodo de vida es más corto probablemente debido al continuo proceso de oxidación natural que se da de forma espontánea después de la oxidación química.

La Hemateína obtenida de la oxidación de la Hematoxilina es aniónica y tiene pobre afinidad con el tejido por lo que para ser utilizada como colorante nuclear debe agregársele un compuesto químico que actúe como mordiente. Los mordientes más utilizados son sales de aluminio, hierro o tungsteno los que le confieren una carga neta

positiva al complejo *mordiente-colorante* lo que facilita su unión a sitios aniónicos en el tejido como es la cromatina nuclear

Las Hematoxilinas de alumbre son las más utilizadas en rutina en conjunto con la Eosina en histología. El mordiente es generalmente sulfato de Aluminio y Potasio. Producen una buena tinción nuclear tiñendo el núcleo de color rojo; posteriormente cambia a azul negrozco cuando el corte es bañado en un medio alcalino como amoníaco en agua al 0.05%. Este proceso es conocido como “viraje”.

La Hematoxilina de Harris, madurada químicamente con óxido de mercurio (altamente tóxico), es una hematoxilina usada como tinción nuclear de rutina en histología debido a su particularmente nítida tinción nuclear y por esta razón se utiliza también en citología exfoliativa.

La Hematoxilina de Harris utilizada en este trabajo se preparó de la siguiente manera:

Hematoxilina.	5.0 g	colorante
Etanol absoluto	50.0 ml	solvente
Sulfato de Aluminio y Potasio	100.0 g	mordiente
Agua destilada.	1000.0 ml	solvente o diluyente
Óxido de Mercurio Rojo	2.5 g	oxidación
Ácido Acético Glacial	40.0 ml	preservante

La Hematoxilina se disuelve en el etanol y luego se agrega a la solución de sulfato de aluminio y potasio previamente disuelta por calor en el agua. La mezcla se lleva hasta punto de ebullición y se le añade suavemente el óxido de mercurio. La solución se enfría rápidamente en hielo y luego se le añade el ácido acético que le da más precisión y tinción selectiva de los núcleos.

LA EOSINA

Es el colorante más comunmente combinado con las Hematoxilinas de alumbre (como la Hematoxilina de Harris), para demostrar la estructura histológica general de los tejidos debido a su habilidad para diferenciar o distinguir el citoplasma de distintos tipos de células y entre diferentes tipos de fibras y matrices del tejido conectivo ya que tñe en distintos grados de intensidad que van desde el rosado naranja o rojo

La eosina es un colorante de tipo Xanteno y es fácilmente obtenido en el comercio local Hay diferentes tipos de eosinas pero de todas, la más utilizada es la *Eosina Y* la cual es soluble en agua y en alcohol La adición de pequeñas cantidades de ácido acético permite que la eosina tñia con más resolución

La Eosina utilizada en este trabajo se prepara de la siguiente manera.

Eosina Y	2.5 g
Agua destilada.	200 ml
Etanol 95%	800 ml

Se disuelve la eosina en el agua y se le añade el etanol Se agrega una gota de ácido acético por cada 100 ml de solución

Otros reactivos utilizados en la tñción de H y E se preparan como se describe a continuación

Agua de Amonia

Amonia en agua al 0.05%

Alcohol ácido

Etanol 70%	1000 ml
Ácido clorhídrico	10 ml

PASOS DE LA TINCIÓN DE HEMATOXILINA Y EOSINA Ver Figura

Nº10

Desparafinar		
Xilol		5 min
Xilol		5 min
Hidratar		
Etanol 95%		30 dips *
Etanol 70%		30 dips
Agua.		30 dips
Tinción Nuclear		
Hematoxilina de Harris		5 min
Lavado en agua.		agua corriente de la pluma
Diferenciación		
Alcohol ácido		3 5 seg
Lavado en agua.		30 dips
Viraje		
Agua de amonia.		5-6 dips**
Lavado en agua.		30 dips
Deshidratación		
Etanol 70%		30 dips
Etanol 95%		30 dips
Tinción citoplasmática		
Eosina Alcohólica.		2 min
Diferenciación y preparación para montaje		
Butanol		30 dips
Butanol		30 dips
Xilol		30 dips
Xilol		30 dips

*dips sumergir y sacar la laminilla en el compuesto rápidamente

** Hasta que cambie de coloración a azul oscuro

FIGURA N° 10**Juego de Tinción de Hematoxilina y Eosina.****2. Tinción de metenamina de plata (Grocott; Luna 1968)**

Existen varios tipos de Tinciones Específicas para identificar hongos como Metenamina - plata de Gomori, de Grocott, Masson – Fontana, PAS, Azul-alcian, Mucicarmín (el PAS tiñe con mayor intensidad el Mucor que el Aspergillus; el Azul-alcian y el Mucicarmín tiñen mejor la cápsula del *Criptococo*).

En este trabajo usamos la tinción de metenamia de plata de Grocott (Grocott; Luna, 1968) ya que es una tinción específica para hongos y puede identificar muy bien el *Batrachochytrium dendrobatidis* en tejidos por lo que nos servirá como una “prueba oro” para compararla con la Hematoxilina y Eosina.

La tinción de metenamia de plata de Grocott es una Tinción para demostrar Hongos en cortes de tejidos. Los polisacáridos de la pared celular del hongo son oxidados a

aldehídos por medio del ácido crómico que es un fuerte oxidante. Solamente estructuras que poseen grandes cantidades de polisacáridos como las paredes celulares de los hongos glucógeno y mucinas puede reaccionar reduciendo la metenamina de plata a plata metálica visible. La metenamina brinda las condiciones alcalinas necesarias para la reacción. El borato de sodio actúa como un buffer y el tiosulfato de sodio remueve los restos de plata no reducida. El cloruro de oro le da una coloración especial al hongo en el tejido.

Para esta tinción se recomienda fijar las muestras con formalina al 10% y cortes de tejidos de 4 a 5 μm incluidos en parafina.

A continuación listamos las diferentes soluciones utilizadas en la tinción y el procedimiento utilizado.

SOLUCIONES

Ácido Crómico al 5 %

Acido crómico	5 0 g
Agua destilada	100 0 ml

La solución de ácido crómico se puede utilizar hasta que se torne oscura.

Solución de Metenamina al 3%

Hexamethylenetetramine U S P	3 0 g
Agua destilada	100 0 ml

Solución de Borax al 5%

Bórax (grado fotográfico)	5 0 g
Agua destilada	100 0 ml

Solución Madre Metanamine-Nitrato de plata

Solución de Nitrato de plata al 5 %	5 0 ml
Solución de metanamine al 3%	100 0 ml

Se forma un precipitado blanco que debe disolverse por agitación. La solución clara se puede usar por mucho tiempo guardada en refrigeración en envases de color ámbar. Debe filtrarse antes de usarla.

Solución de trabajo Metenamina-Nitrato de Plata

Bórax al 5%	2 0 ml
Agua destilada	25 0 ml

Mezclar bien y agregar	
Solución Madre preparada arriba	25 0 ml
<i>Solución de bisulfito de sodio al 1%</i>	
Bisulfito de sodio	1g
Agua destilada	100 0 ml
<i>Solución de Cloruro de Oro al 0.1 %</i>	
Solución de cloruro de oro al 1 %	10 0 ml
Agua destilada	90 0 ml
<i>Solución de tiosulfato de sodio al 2 %</i>	
Tiosulfato de sodio	2 0 g
Agua destilada	100 0 ml
<i>Solución Madre de Light Green</i>	
Ligth green S F	0 2 g
Agua destilada	100 0 ml
Ácido acético glacial	0 2 ml
<i>Solución de trabajo de Light Green</i>	
Solución madre de Light green	10 0 ml
Agua destilada	50 0 ml

PROCEDIMIENTO

- 1 Desparafinar

Xilol	5 min
Xilol	5 min
- 2 Hidratar llevando las placas con las muestras a teflur hasta el agua destilada

Etanol 95%	30 dips *
Etanol 70%	30 dips
Agua.	30 dips
- 3 Oxidar en ácido crómico

Acido crómico al 5%	1 hora
---------------------	--------
- 4 Lavar en agua corriente
- 5 Remover el acido crómico residual

Bisulfito de sodio al 1%	1 min
--------------------------	-------
- 6 Lavar en agua corriente continua

	5 a 10 minutos
--	----------------
- 7 Lavar con agua destilada.
- 8 Impregnación con plata.

Solución de trabajo de Metenamina Nitrato de Plata 15 minutos a 58 -60 °C observándolas a intervalos de 10 minutos hasta que se tornen de un color chocolate claro o ámbar Trabajar con pinzas bañadas en parafina.

Enjuagar y verificar al microscopio la impregnación de plata adecuada, los hongos deben verse de color chocolate oscuro si la impregnación no es suficiente regresar las placas a la solución y verificar cada 5 minutos hasta adquirir una

buena impregnación de plata. Esta tinción se debe realizar con ayuda de un control positivo (una placa que con anticipación sabemos que contiene hongos) y es en este control positivo donde se deben hacer las verificaciones de la impregnación de plata.

- 9 Pasar por 6 cambios de agua destilada
- 10 Colocar en

Cloruro de oro 0.1%	2 a 5 minutos
---------------------	---------------
- 11 Lavar con agua destilada
- 12 Remover la plata no reducida

Tiosulfato de sodio al 2%	2 minutos
---------------------------	-----------
- 13 Lavar cuidadosamente en agua de la pluma
- 14 Contrastar

Solución de trabajo de Light Green	1 min.
------------------------------------	--------
- 15 Deshidratar

Alcohol al 95%	
Alcohol absoluto	
- 16 Aclarar

Xilol	30 dips
Xilol	30 dips

Una vez teñidas las preparaciones histológicas de la manera indicada, esperamos observar las siguientes tonalidades en la placa

Hongos	Ligeramente delineados en negro
Mucina	Gris negro
Micelas e hifas	Rosa vieja
Campo	verde pálido

Después de la tinción, las preparaciones se secan y se procede al montaje

VIII- Montaje

El montaje consiste en la colocación de un cubreobjeto sobre el tejido para protegerlo de la desecación, de la invasión de microorganismos y de la manipulación. Para que el cubreobjeto se adhiera a la placa se utilizan los denominados medios de montaje los cuales pueden ser naturales como el Bálsamo de Canadá o artificiales como el Permout. En nuestro trabajo utilizamos el Permout Ver Figura N° 11

Luego de montar la placa, hay que dejarla secar y posteriormente podemos realizar todas las observaciones microscópicas necesarias.

FIGURA N° 11

Montaje de las placas histológicas para su posterior observación.



CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS

PRIMERA PARTE DE LA INVESTIGACIÓN Valorar el uso de la Hematoxilina y Eosina para identificar adecuadamente al *Batrachochytrium dendrobatidis* en cortes histológicos de piel del *Atelopus varius* colectados muertos o moribundos.

1 RECOLECCIÓN DE DATOS

Toda la información procesada en el presente trabajo de investigación se obtuvo de la lectura de las placas histológicas preparadas con los segmentos de piel extraídos de las diferentes partes del cuerpo de los especímenes de *Atelopus varius* teñidos con Metenamida de plata y Hematoxilina y Eosina y examinados al microscopio de luz con un aumento de 400 (objetivo de 40X y ocular de 10X)

a) Datos obtenidos

Los datos obtenidos en esta primera parte de la investigación se resumen en el siguiente cuadro

CUADRO N° I

IDENTIFICACIÓN DEL *Batrachochytrium dendrobatidis* CON HEMATOXILINA Y EOSINA Y METENAMINA DE PLATA EN PIEL DE DIFERENTES PARTES DEL CUERPO ESPECÍMENES DE *Atelopus varius*.

Muestra	Metenamina de Plata	Hematoxilina y Eosina
3I	+	+
3A	+	+
3D	+	+
3M	+	+
3V	++	+
3T	+	+
4A	+	+
4D	+	
4M	+	+
4V	+	+
4T	+	+
5V	++++	++++
6I	+++	+++
6A	+++	+++
6D	+	+
6M	++	++
6V	++++	++++
6T	+++	+++
7I	++++	++++
8I	++++	+++
8A	++++	++++
8D	++++	+
9I	++++	++++
10A	++	+
10D	+++	+
13I	++++	++++
13A	++	++
13D	++	+++

Muestra	Metenamina de Plata	Hematoxilina y Eosina
13 M	+++	++
13 V	++++	++++
13 T	+++	+++
15 I	++	++++
15 M	+++	++++
15 V	++++	++++
15 T	+	+
17 D	++++	++++
18 A	+	+
18 D	+	++
27 I	++	++
27 D	+	+
27 V	++++	++++
27 T	++++	+++
28 I	+++	++
28 A	+	
28 D	+	+
28 M	++	+
28 V	+	+
29 A	++	++

Los números representan a los diferentes especímenes de *Atelopus varius* estudiados

Las letras a las diferentes partes del cuerpo

I ingle

A abdomen

D dorso

M región dorsal del muslo

V piel de la membrana entre T4 y T5

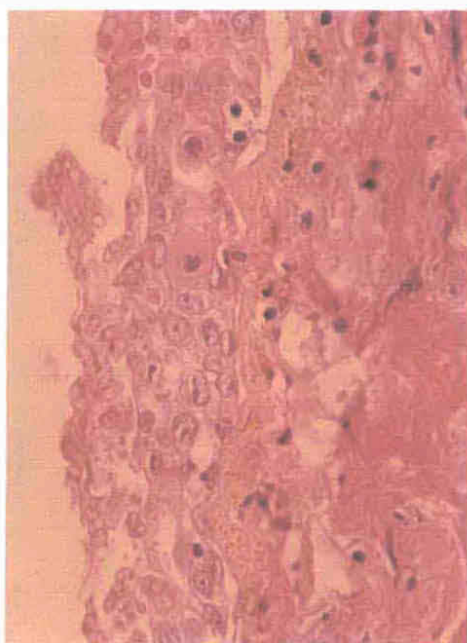
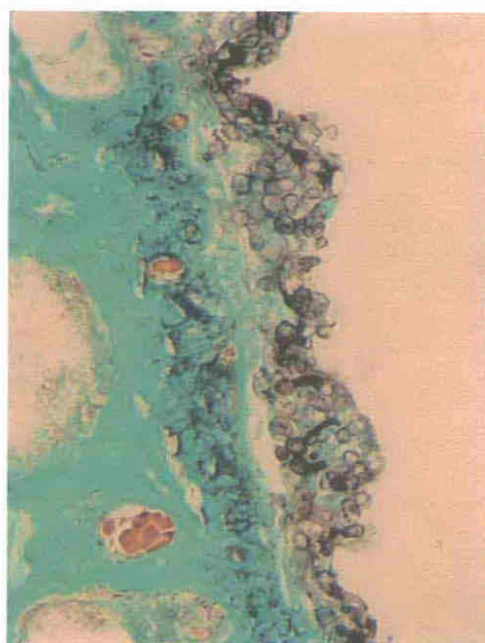
T corte transversal del IV dedo

b) Interpretación de los datos:**Muestras Positivas:**

Se consideró una muestra de tejido positiva siempre que fue posible observar esporangios del hongo vacíos o con esporas en el corte histológico de piel teñido con cualquiera de las tinciones. Los esporangios se observan con metenamina de plata delineados en color negro y con H y E de color rosado intenso. (Figura N° 12).

FIGURA N° 12

Imagen observada al microscopio de luz de los esporangios de *Batrachochytrium dendrobatidis* teñidos con Hematoxilina y Eosina y con Metenamina de plata en piel de *Atelopus varius*.

**Hematoxilina y Eosina****Metenamina de plata**

En este estudio se utilizó la siguiente escala para identificar el grado de infección del hongo

- + presencia de 1 a 5 esporangios en un segmento de 0.5 mm de piel
- ++ presencia de 6 a 10 esporangios en un segmento de 0.5 mm de piel
- +++ presencia de 11 a 15 esporangios en un segmento de 0.5 mm de piel
- ++++ más de 15 esporangios en un segmento de 0.5 mm de piel

Para determinar la cantidad de esporangios visibles se contaron al menos 5 campos diferentes de 0.5 mm de piel y luego se sacó un promedio de lo observado

Muestras Negativas

Una muestra se consideró negativa si al observar la preparación histológica de piel teñida con cualquiera de las tinciones no fue posible identificar esporangios en al menos 5 campos diferentes de 0.5 mm de piel

2 PROCESAMIENTO DE LOS DATOS

Los datos obtenidos se procesaron con la ayuda del siguiente cuadro para calcular la sensibilidad, especificidad y valor predictivo del uso de la tinción de Hematoxilina y Eosina en la detección del *Batrachochytrium dendrobatidis* en cortes histológicos de piel de *Atelopus varius*

SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD, VALOR PREDICTIVO

		Tinción con Metenamina de Plata	
		+	
Tinción con Hematoxilina y Eosina	+	a	b (falsos positivos)
	-	c (falsos negativos)	d

Se evaluaron 48 muestras como podemos observar en el CUADRO N° 1 de las cuales 46 fueron positivas para ambas tinciones 2 fueron positivas para Metenamina de Plata y negativa para Hematoxilina y Eosina, ninguna fue negativa en ambas tinciones y ninguna fue negativa en Hematoxilina y Eosina y positiva con Metenamina de plata. Esta información se resume en el cuadro siguiente

		Tinción con Metenamina de Plata	
		+	
Tinción con Hematoxilina y Eosina	+	46 (a)	(b) 0
	-	2 (c)	(d) 0

a) **Sensibilidad** capacidad de identificar correctamente los positivos

$$\frac{a}{a + c} = \frac{46}{46+2} = \frac{46}{48} = 0.958$$

b) Especificidad Capacidad de identificar correctamente los negativos

No se pudo calcular la especificidad debido a que todos los especímenes estudiados resultaron positivos por el *Batrachochytrium dendrobatidis* con la tinción utilizada como prueba oro (Metenamina de Plata). Como no tenemos especímenes negativos, no podemos determinar la capacidad de la prueba para identificar correctamente a los negativos.

a) Valor Predictivo Probabilidad de que un individuo con prueba positiva padezca la enfermedad

$$\frac{a}{a + b} = \frac{46}{46 + 0} = \frac{46}{46} = 1$$

3 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Se examinaron 48 pares de muestras de piel de diferentes partes del cuerpo de *Atelopus varius* procesadas exactamente igual con la única diferencia que un miembro de cada par se tiñó con Hematoxilina y Eosina y el otro con Metenamina de plata. Se leyeron las preparaciones histológicas buscando esporangios en el tejido.

Todas las muestras examinadas estaban infectadas con *Batrachochytrium dendrobatidis* según los resultados obtenidos con la tinción con Metenamina de plata. La tinción de Hematoxilina y Eosina fue capaz de identificar las muestras como positivas en 46 de las 48 muestras estudiadas.

Es importante hacer notar que las muestras que dieron positivas por *Batrachochytrium dendrobatidis* con la tinción de Metenamina de plata y negativas con la tinción de H y E fueron muestras que mostraron tener muy pocos esporangios

Luego de hacer los cálculos correspondientes encontramos una sensibilidad de 95.8% y un valor predictivo de 1 para la tinción de Hematoxilina y Eosina.

En cuanto a la metodología de las tinciones utilizadas podemos decir que la H y E es una tinción fácil de realizar y permite manejar volúmenes grandes de muestras. La tinción de Metenamina de plata es muy tediosa, es necesario realizarla con pocas muestras a la vez y se necesita utilizar un control positivo (tejido en donde previamente se ha diagnosticado la presencia del hongo que se busca) debido a que por muchas causas metodológicas la tinción puede marcar negativa a pesar de estar positivas. La tinción de H y E permite observar con facilidad los esporangios llenos de zoosporas listos para descargar las zoosporas y vacíos en el tejido y además nos permite observar la arquitectura normal de la piel: epidermis, dermis, glándulas, pigmentación y las posibles alteraciones que se producen en el tejido a causa de la infección del hongo o por la lisis tisular presentada antes de la fijación de los tejidos.

SEGUNDA PARTE DE LA INVESTIGACIÓN: Identificar las partes anatómicas del *Atelopus varius* colectados muertos o moribundos, donde se puede diagnosticar con mayor facilidad el *Batrachochytrium dendrobatidis* en cortes histológicos de piel.

1. RECOLECCIÓN DE DATOS:

Toda la información procesada en esta parte de la investigación se obtuvo de la lectura de las placas histológicas preparadas con los segmentos de piel extraídos de las diferentes partes del cuerpo de los especímenes de *Atelopus varius* teñidos con Hematoxilina y Eosina y examinados al microscopio de luz con un aumento de 400 (objetivo de 40X y ocular de 10X).

a) Datos obtenidos:

Los datos obtenidos en esta segunda parte de la investigación se resumen en el siguiente cuadro:

CUADRO N° II

IDENTIFICACIÓN DEL GRADO DE INFECCIÓN DE *Batrachochytrium dendrobatidis* CON HEMATOXILINA Y EOSINA EN PIEL DE DIFERENTES PARTES DEL CUERPO DE *Atelopus varius*.

Número	Hematoxilina y Eosina					
	I	A	D	M	V	T
1.	-	++	+	+++	+++	+
2.	-	-	-	+	+	+

	Hematoxilina y Eosina					
3.	+	+	+	+	+	+
4.	++	+	-	+	+	+
5.	+	++	+	++	++++	++
6.	+++	+++	+	++	++++	+++
7.	++++	++++	+	++	++++	++
8.	+++	++++	+	++++	++++	+
9.	++++	++++	+	++	++++	++++
10.	++++	+	+	++++	++++	+
11.	++++	++++	+	+	+	+
12.	-	+	+	++	++++	-
13.	++++	++	+++	++	++++	+++
14.	++	+++	-	+	+++	++
15.	++++	++++	+	++++	++++	+
16.	-	++++	-	++	++++	++
17.	-	-	++++	++++	++++	+
18.	++++	+	++	++	+	++++
19.	-	++++	++	++	+++	+
20.	++	+	+	+	++++	+
21.	++++	+++	+	+	++++	+++
22.	+	+	-	-	-	-
23.	-	-	-	++	++	-
24.	-	++++	+	++++	++++	+
25.	++++	+++	+	+	++++	+++
26.	++	++++	++++	++++	++++	+++
27.	++	++++	+	++	++++	+++
28.	++	-	+	+	+	+++
29.	+	++	+	+	+	++

Las letras indican la parte anatómica del *Atelopus varius* de donde se obtuvo la muestra:

I: ingle

A: abdomen

D: dorso

M: región dorsal del muslo

**V: piel de la membrana
entre T4 y T5**

**T: corte transversal del
IV dedo.**

Los números corresponden a los diferentes individuos de *Atelopus* estudiados.

Las **cruces** indican el grado de infección y se han sombreado los cortes de las partes de piel en donde se observó mejor el hongo.

+: presencia de 1 a 5 esporangios en un segmento de 0.5 mm de piel.

++: presencia de 6 a 10 esporangios en un segmento de 0.5 mm de piel.

+++ : presencia de 11 a 15 esporangios en un segmento de 0.5 mm de piel.

++++ : más de 15 esporangios en un segmento de 0.5 mm de piel.

b) Interpretación de los datos

Si tomamos en cuenta las muestras positivas y negativas encontradas en cada una de las partes anatómicas estudiadas podemos resumir la información del cuadro N° 2 en el siguiente cuadro

CUADRO N° III

**MUESTRA POSITIVAS Y NEGATIVAS TEÑIDAS CON HYE
ENCONTRADAS EN PIEL DE LAS DIFERENTES PARTES DEL
CUERPO DEL *Atelopus varius* EXAMINADAS**

Parte del cuerpo	Observaciones	
	+	-
Ingle	22	8
Abdomen	26	4
Dorso	24	6
Muslo	29	1
Membrana entre T4 y T5	29	1
Corte transversal del IV dedo	27	3

Fuente Cuadro numero 2

En todos los individuos de *Atelopus* estudiados se encontraron esporangios en al menos dos de los sitios anatómicos estudiados, por lo que podemos concluir que todos nuestros especímenes estaban infectados por el *Batrachochytrium dendrobatidis*

2. PROCESAMIENTO DE LOS DATOS

Tomando en cuenta lo anterior podemos determinar la sensibilidad y valor predictivo del uso de cada una de las muestras de piel estudiadas con la utilización del cuadro siguiente

		Especímenes estudiados	
		+	-
Muestras de Ingle	+	22 (a)	(b) 0
	-	8 (c)	(d) 0
Muestras de Abdomen	+	26	0
	-	4	0
Muestras de Dorso	+	24	0
	-	6	0
Muestras de Muslo	+	29	0
	-	1	0
Muestras de Membrana	+	29	0
	-	1	0
Muestras de IV dedo	+	27	0
	-	3	0

a) Cálculo de Sensibilidad y Valor Predictivo de cada muestra estudiada

	SENSIBILIDAD	VALOR PREDICTIVO	ESPECIFICIDAD
Definición	Capacidad de identificar correctamente los positivos	Probabilidad de que un individuo con prueba positiva sea realmente positiva.	Capacidad de identificar correctamente los negativos

	SENSIBILIDAD	VALOR PREDICTIVO	ESPECIFICIDAD
Fórmula para calcularla	$\frac{a}{a + c}$	$\frac{a}{a + b}$	$\frac{d}{b + d}$
Muestras de Ingle	0 73	1	No se pudo calcular la especificidad debido a que todos los especímenes estudiados resultaron positivos por el <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> con la tinción H y E en al menos 2 de los fragmentos de piel estudiadas
Muestras de Abdomen	0 86	1	
Muestras de Dorso	0 80	1	
Muestras de Muslo	0 97	1	
Muestras de Membrana entre T4 y T5	0 97	1	
Corte transversal del IV dedo	0 90	1	

b) Estudio del grado de infección encontrada en las diferentes muestras

Estudiamos el grado de infección que observamos en la piel de cada una de las diferentes partes anatómicas del *Atelopus varius* valorándolas con + ++ +++ y ++++ según el número de esporangios observados en segmentos de 5 mm de piel. Comparamos el grado de infección encontrada en las muestras de piel de las diferentes partes anatómicas estudiadas y seleccionamos aquella muestra en la que se observaba mejor la infección por presentar un mayor número de esporangios llenos o vacíos.

El cuadro N° IV resume las observaciones realizadas

CUADRO N° IV

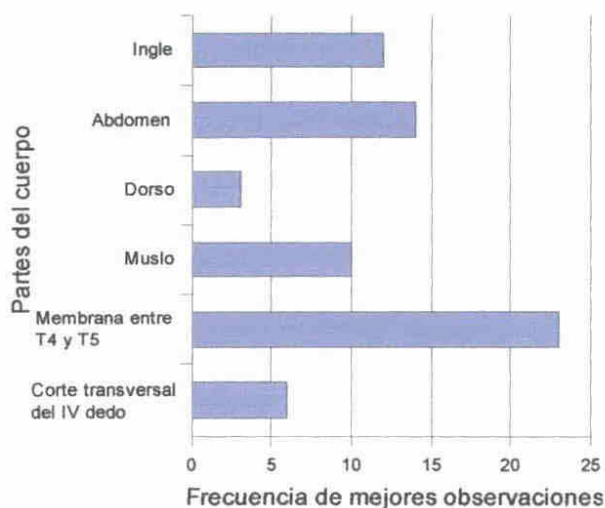
FRECUENCIA DE MEJORES OBSERVACIONES DEL *Batrachochytrium dendrobatidis* EN PIEL OBSERVADAS CON HYE SEGÚN LAS DIFERENTES PARTES DEL CUERPO DEL *Atelopus varius* EXAMINADAS, TOMANDO EN CUENTA LA INTEGRIDAD DEL TEJIDO Y EL GRADO DE INFECCIÓN ENCONTRADA.

Parte del cuerpo	Mejores observaciones
Ingle	12
Abdomen	14
Dorso	3
Muslo	10
Membrana entre T4 y T5	23
Corte transversal del IV dedo	6

Fuente: Cuadro número 2.

FIGURA N° 13

Frecuencia de mejores observaciones del *Batrachochytrium dendrobatidis* en piel observadas con HyE según las diferentes partes del cuerpo del *Atelopus varius* examinadas, tomando en cuenta la integridad del tejido y el grado de infección encontrada.



Fuente: Cuadro N° IV.

3 ANALISIS DE LOS RESULTADOS

Tomando en cuenta la sensibilidad para detectar la presencia o no del *Batrachochytrium dendrobatidis* en muestras de piel teñidas con H y E podemos observar que las muestras extraídas del muslo y de la membrana entre T4 y T5 son superiores que todas las demás muestras ya que en ambos casos encontramos una sensibilidad de 97 %

Si tomamos en cuenta el grado de infección del hongo observado en las placas de piel examinadas medidas por numero de esporangios observados en un segmento de 0.5 mm de piel podemos ver en el Cuadro N° 3 y Gráfica N° 1 que el segmento de piel extraído de la membrana entre T4 y T5 es donde obtenemos la mayor cantidad de mejores observaciones de la infección por este hongo en ranas encontradas muertas o moribundas

En la mayoría de los especímenes en donde la muestra de la membrana entre T4 y T5 no fue la mejor para diagnosticar el *Batrachochytrium dendrobatidis* no fue por estar negativa, sino por que en alguna de la otras muestras estudiadas se observó mejor el tejido o el grado de infección detectado fue mayor

Solamente en uno de los especímenes estudiados la muestra de la membrana entre T4 y T5 dió negativa, estando positiva en alguna de las otras partes del cuerpo estudiadas y esto ocurrió en un espécimen cuya grado de lisis tisular era alto

La diferencia en el grado de infección encontrada entre las muestras extraídas del muslo y las de la membrana entre T4 y T5 se pueden explicar en base a que a pesar de dar positivo la infección, la cantidad de esporangios encontrados en el muslo es en terminos generales mucho menor que los encontrados en la membrana entre T4 y T5 lo

cual podría llevarnos a diagnosticar muestras de muslo negativas en infecciones iniciales, con un escaso numero de esporangios. Estos hallazgos se explican fácilmente si tomamos en cuenta la posición anatómica de las ranas y el contacto de su cuerpo con el suelo.

4 DISCUSIÓN

Las partes ventrales del cuerpo que están en mayor contacto con el suelo presentan mayor presencia de esporangios. Es posible que la infección se inicie en estas regiones. La única región anatómica que no va de acuerdo con lo expuesto anteriormente es el corte transversal del IV dedo en donde también observamos que la epidermis es mucho más gruesa que en todas las demás regiones estudiadas.

En algunos trabajos se ha postulado la hiperqueratosis como causa de muerte de los anfibios. En este trabajo no observamos hiperqueratosis; por el contrario observamos un epitelio descamado, con pocas capas celulares. En casos avanzados desaparece el epitelio y en su lugar observamos capas de esporangios.

En nuestras observaciones no encontramos relación entre la presencia de esporangios o el número de ellos con la presencia de glándulas de la dermis o con el grado de pigmentación de la piel del *Atelopus varnus*.

En cuanto a las ventajas y desventajas de la utilización de la piel de las diferentes partes del cuerpo podemos decir lo siguiente:

Ingle

- No es fácil obtener muestras de esta región en ranas vivas por lo que no sería factible realizar tamizaje de una población de ranas de una región con muestras de

este tipo sin sacrificar al animal. Aun en animales muertos la extracción de la muestra se dificulta un poco debido al pliegue normal del área.

- El procesado corte y tinción del tejido no presenta mayor dificultad
- A pesar de ser el tercer lugar en donde se observan mejor los esporangios, también es donde encontramos mayor lisis del tejido lo que puede llevar a errores en la tinción y lectura, y posiblemente esta es la razón por la que encontramos en estas regiones una baja sensibilidad para detectar la infección por el hongo (73%)

Abdomen

- No es fácil obtener muestras de esta región en ranas vivas por lo que no sería factible realizar tamizaje de una población de ranas de una región con muestras de este tipo sin sacrificar al animal. En animales muertos la extracción de la muestra es muy sencilla.
- El procesado corte y tinción del tejido no presenta mayor dificultad
- Para las muestras de piel de abdomen encontramos una sensibilidad para detectar el hongo de 86% a pesar de ser el segundo sitio en número de esporangios observados. Lo que nos dice que cuando hay una infección importante se va a observar muy bien en la piel de esta región pero posiblemente en infecciones iniciales no podremos observarla más fácilmente en esta muestra que en otras.

Dorso

- No es fácil obtener muestras de esta región en ranas vivas por lo que no sería factible realizar tamizaje de una población de ranas de una región con muestras de este tipo sin sacrificar al animal. En animales muertos la extracción de la muestra es muy sencilla.

- El procesado corte y tinción del tejido no presenta mayor dificultad
- De todas las áreas anatómicas de donde se extrajo muestra de piel para el presente estudio el dorso es donde se observó menos la presencia de esporangios por lo que no recomendamos muestras de esta región El dorso del animal es el que menos está en contacto con el suelo por lo que vamos a observar la presencia del hongo solamente cuando ya se ha diseminado por todo el cuerpo del animal Esto nos explica la sensibilidad encontrada en esta región anatómica para el diagnóstico histológico del hongo que es solamente de 80 %

Muslo

- No es fácil obtener muestras de esta región en ranas vivas por lo que no sería factible realizar tamizaje de una población de ranas de una región con muestras de este tipo sin sacrificar al animal En animales muertos la extracción de la muestra es muy sencilla.
- El procesado corte y tinción del tejido no presenta mayor dificultad
- La piel del muslo nos brinda una buena observación del tejido y presenta una sensibilidad alta (97%) para la detección del hongo pero al comparar el grado de infección observada en esta región con las otras regiones estudiadas observamos que ocupa el cuarto lugar de mejores observaciones de los esporangios del hongo Por esta razón, aunque es una buena región para el estudio no es la mejor encontrada.

Membrana entre T4 y T5

- Las muestras de la membrana son fáciles de obtener y nos permite observar mayor área debido a que tenemos epidermis a ambos lados de la muestra.

- El procesado corte y tinción del tejido no presenta mayor dificultad
- La piel de esta region es una de las que presentan mayor sensibilidad para la detección del hongo (97 %) además en este estudio demostramos que es el sitio anatómico donde encontramos mayor cantidad de esporangios del hongo En esta muestra encontramos una doble capa epitelial lo que favorece la observación ya que nos permite examinar mayor cantidad de piel Por lo anterior es la muestra que recomendamos para el diagnóstico histológico del *Batrachochytrium dendrobatidis* en piel de *Atelopus varius*

Corte transversal del IV dedo

- Las muestras son muy fáciles de obtener ya que solamente cortamos el extremo distal del dedo del animal Este procedimiento es también utilizado para marcar ranas vivas
- El procesamiento del tejido es un poco más complicado que las otras áreas estudiadas debido a la presencia de hueso en la muestra lo que dificulta un poco el procesamiento y sobre todo el corte del tejido
- Las muestras del corte transversal del dedo a pesar de estar en contacto con el suelo no mostraron gran cantidad de esporangios el epitelio en esta región es mucho más grueso que el resto lo cual le puede brindar mayor defensa ante el hongo y por lo tanto observar menor cantidad de esporangios sin embargo esta región también presenta una buena especificidad (90%) para el diagnóstico del hongo

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

1 Valorar el uso de la Hematoxilina y Eosina para identificar adecuadamente al *Batrachochytrium dendrobatidis* en cortes histológicos de piel del *Atelopus varius* colectados muertos o moribundos.

- Todos los *Atelopus varius* colectados muertos o moribundos en el Copé a finales del 2004 estaban infectados por *Batrachochytrium dendrobatidis* según lo demuestra el diagnóstico histológico realizado con la tinción especial de Metenamina de plata.
- La sensibilidad de la tinción de Hematoxilina y Eosina para identificar al *Batrachochytrium dendrobatidis* es de 95,8 % por lo tanto podemos decir que la Tinción de Hematoxilina y Eosina es capaz de identificar correctamente el 95,8% de los especímenes positivos con el *Batrachochytrium dendrobatidis* en piel de *Atelopus varius*.
- El 100 % de los especímenes de piel de *Atelopus varius* con identificación positiva con la tinción de Hematoxilina y Eosina, realmente deben presentar el *Batrachochytrium dendrobatidis* debido a que el valor predictivo calculado para la tinción de Hy E en el presente trabajo es de 1.

- La especificidad de la tinción de Hy E no se pudo calcular debido a que no obtuvimos especímenes negativos con la tinción de Metenamina de plata.

2 Identificar las partes anatómicas del *Atelopus varius* colectados muertos o moribundos donde se puede diagnosticar con mayor facilidad el *Batrachochytrium dendrobatidis* en cortes histológicos de piel.

- Tomando en cuenta aspectos como la integridad del epitelio la presencia o no de los esporangios del hongo y el grado de infección encontrado (numero de esporangios por campo examinado) en todos los segmentos de piel estudiados de cada especimen, podemos determinar que de todas las partes estudiadas en este trabajo la que presenta más evidentemente la infección por el hongo es la membrana entre T4 y T5
- La piel extraída del muslo y de la membrana entre T4 y T5 fueron las muestras que demostraron tener mayor sensibilidad para el diagnóstico histológico del *Batrachochytrium dendrobatidis* en piel del *Atelopus* teñida con H y E
- En 23 de los 30 especímenes estudiados la mejor muestra para diagnosticar la presencia del *Batrachochytrium dendrobatidis* en piel teñida con H y E fue la muestra obtenida de la membrana entre T4 y T5 Por todo lo anterior podemos concluir que el mejor sitio anatómico del cuerpo del *Atelopus* para buscar la infección por el hongo es la membrana entre los dedos T4 y T5 de las patas traseras

- Después de las muestras de la membrana entre T4 y T5 podemos recomendar para el diagnóstico histológico del *Batrachochytrium dendrobatidis* en piel muestras de abdomen, ingle y muslo en ese orden. Las muestras de piel del corte transversal del dedo o del dorso del animal no los recomendamos debido a la baja sensibilidad encontradas en ambas y a las dificultades que puede representar el procesamiento de dichas muestras.

RECOMENDACIONES

Basados en los resultados obtenidos en esta investigación podemos recomendar lo siguiente

- Utilizar la tinción de Hematoxilina y Eosina para la detección del *Batrachochytrium dendrobatidis* en piel de anfibios colectados muertos o moribundos debido a que presenta una buena sensibilidad y valor predictivo y que además, es una prueba con un bajo grado de dificultad que puede realizarse sin necesidad de laboratorios sofisticados
- La tinción de Hy E puede ser utilizada como prueba de tamizaje por su alta sensibilidad en la detección de infecciones por *Batrachochytrium dendrobatidis* en piel de anfibios
- Encontramos destrucción del epitelio en sitios donde hay abundantes esporangios esta destrucción puede estar causada por el hongo o por el grado de lisis celular debido al tiempo transcurrido desde la muerte del animal y la colecta. Para aclarar este punto recomendamos realizar una investigación similar utilizando ranas encontradas aun vivas para descartar que la destrucción del epitelio sea causada por la lisis celular por falta de fijación temprana.

- Según los resultados obtenidos en esta investigación, el mejor sitio anatómico para obtener muestras de piel para el diagnóstico histológico de *Batrachochytrium dendrobatidis* en ranas muertas o moribundas es la membrana entre los dedos de las patas traseras, especialmente entre T4 y T5

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFÍA

Alexopoulos C J Mims, C W Blackwell M 1996 Introductory Mycology 4ta edición
Wiley and Sons New York USA 869 p

Arias J E 1992 Manual de Laboratorio y Guía por objetivos I edición Panamá
Editorial Universitaria. 24 31

Barr D J S 1990 Phylum Chytridiomycota. En Handbook of Proctista. P 130 131
Editores Margulis L Corliss, J O Melkonian, M y Chapman, D J Jones and Bartlett,
Boston, EEUU

Berger L Speare R. Daszak, P Green, D E Cunningham, A A Goggins, C L
Slocombe R. Ragan, M A Hyatt, A D McDonald, K R. Hines H B Lips K.R.
Marantelli G Parkes H 1998 Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated
with population declines in the rain forests of Australia and Central America. Proceedings
of the National Academy of Sciences 95 9031 9036

Berger L Speare R. Hyatt, A 1999 Chytrid fungi and amphibian declines Overview
implications and future directions en Declines and Disappearances of Australian frogs
Editado por Alastair Campbell 54 p

Berger L. Speare R. Kent A. 1999 Diagnosis of chytridiomycosis in amphibians by histologic examination. World Wide Web file
<http://www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/histo/chhiso.htm>

Blaustein, A. R. Wake D. B. 1995 The Puzzle of Declining Amphibian Populations
 Scientific American April 52-57

Blaustein, A. R. Wake D. B. Sousa, W. P. 1994 Amphibian declines judging stability persistence and susceptibility of populations to local and global extinctions Cons Biol 8 60-71

Carey C. L. 1993 Hypothesis concerning the cause of the disappearance of boreal toads from the mountains of Colorado Cons Biol 7 355-362

Carson, F. L. 1997 Histotechnology Self Instructional Text. II edición American Society of Clinical Pathologists Pág. 191-197

Crump M. L. Pounds, J. A. 1985 Lethal parasitism of an aposematic anura (*Atelopus varius*) by *Nocheta bufonivora* (Diptera: Sarcophagidae) J Parasit. 71 588-591

Deacon, J. W. 1990 Introducción a la Micología Moderna. Primera edición México Editorial Limusa. Pág. 19-29

Jaramillo C A 2003 Apuntes de Técnicas Histológicas Facultad de Medicina. Universidad de Panamá.

Joyas que están desapareciendo El estado de los anfibios en el Nuevo mundo Apéndice 3 Lista completa de especies Global Amphibian Assessment.

Lips K R. Green, D E Papendick, R 2003 Chytridiomycosis in Wild Frogs from Southern Costa Rica. Journal of Herpetology 37 215-218

Lips K 1998 Decline of a tropical montane amphibian fauna. Cons Biol 12 106-117

Lips K. 1999 Mass mortality and population declines of anurans at an upland site in western Panama. Cons Biol 13 117-125

Longcore J E Pessier A P Nichols D K 1999 *Batrachochytrium dendrobatidis* gen et sp nov a chytrid pathogenic to amphibians Mycologia. 91(2) 219 227

Lowe S et al 2004 100 de las especies exóticas invasoras más dañinas del mundo Revista Aliens

Lynch, M J Raphael S S Mellor L D Spare P D Inwood, M J 1997 Metodos de Laboratorio Segunda Edición Editorial Interamericana. México D F Pág 1099 – 1171 y 1259 – 1260

Pechmann, J H K Wake D B 1997 Declining and disappearance of amphibian populations En Principles of Conservation Biology ed GK Meffe CR. Carroll 2^{da} edición MA, EEUU p 135 137

Pounds J A. Crump M L 1994 Amphibian declines and climate disturbance the case of the golden toad and the harlequin frog Cons Biol 8 72 85

Pounds J A Fodgen, M P L Campell J H 1999 Biological response to climate change on a tropical mountain Nature 398 611 615

Pounds J A Fodgen, M P L Savage J M Gorman, G C 1997 Test of null models for amphibian declines on a tropical mountain Cons Biol 11 1307 1322

Powell M J 1993 Looking at mycology with a Janus face a glimpse at chitridiomycetes active in the environment Mycologia 85 1 20

Puschendorf R. 2004 *Batrachochytrium dendrobatidis* en Costa Rica, un hongo que ataca anfibios Tesis sometida a la consideración del Programa de Estudios de Posgrado en Biología para optar al grado de Magister Scientiae

Teakle D S 1983 Zoosporic Fungi and Viruses, Double Trouble P 233 248
 En Zoosporic Plant Pathogens A Modern Perspective Editor Buczak S T Academic
 Londres, Inglaterra.

Warburg, M R. Lewinson, D Rosenberg M 1994 en Amphibian Biology The
 Integument. Editores Heatwole H Y Barthalamus G T Surrey Beatty & Sons, Chipping
 Norton, Australia. Vol 1 33 63

Welsch, U Storch, V 1976 Estudio Comparado de la Citología e Histología Animal
 España. Urmo S A de ediciones

WWW Wheelock edu/faculty/EllenFaszewski_research pdf

ANEXOS

ANEXO N° 1**PROBLEMAS MAS COMUNES EN EL CORTE CON MICRÓTOMO DE ROTACIÓN
Y SUS POSIBLES CAUSAS**

- 1 Cintas de tejidos corren hacia un lado**
 - * Cuchilla y bloque no están paralelos
 - * Bloque no es rectangular
 - * El filo de la cuchilla es irregular
 - * Parafina impura, no homogénea
- 2 Cortes comprimidos**
 - * Cuchilla sucia
 - * Cuchilla y bloque calientes
 - * Angulo de la cuchilla muy vertical
 - * Cortes muy delgados
- 3 Desmenuzamiento de los cortes**
 - * Deshidratación, aclaramiento o inclusion incompletos
 - * Utilización de la parafina muy caliente en la inclusión o el bloqueo
- 4 Rayas o rasguños en el corte**
 - * Cuchilla sin filo
 - * Sucio en el borde de la cuchilla
 - * Angulo de la cuchilla muy grande
 - * Artefactos como cristales o material calcáreo en tejido o parafina
- 5 Cortes quedan pegados al bloque**
 - * Cuchilla muy vertical
 - * Sucio en el filo de la cuchilla
- 6 Alternancia de cortes gruesos y delgados**
 - * Bloques muy largos
 - * Perdida en el set de tornillos del bloque
 - * Tejido muy duro
 - * Angulo de la cuchilla insuficiente
 - * Pérdida del filo de la cuchilla

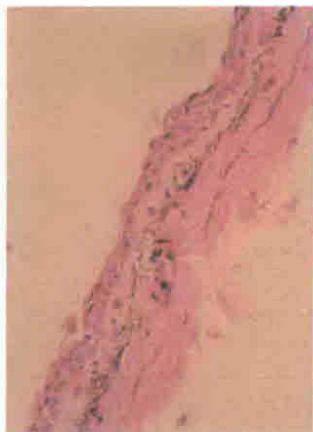
ANEXO N° 2

FOTOS HISTOLÓGICAS DE ALGUNOS DE LOS CORTES DE PIEL DE *Atelopus varius* EXAMINADOS

Fotos de muestras histológicas de piel de *Atelopus varius* negativas por *Batrachochytrium dendrobatidis* teñida con Hematoxilina y Eosina



Fotos de muestras histológicas en las que se observó de 1 a 5 esporangios de *Batrachochytrium dendrobatidis* en un segmento de 0.5 mm de piel de *Atelopus varius* con Metenamina de Plata y Hematoxilina y Eosina.



Hematoxilina y Eosina

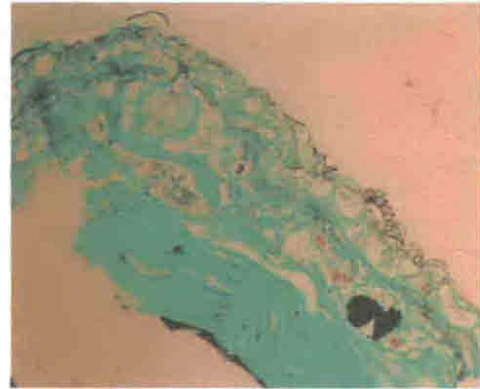


Metenamina de plata

Fotos de muestras histológicas en las que se observó de 6 a 11 esporangios de *Batrachochytrium dendrobatidis* en un segmento de 0.5 mm de piel de *Atelopus varius* con Metenamina de Plata y Hematoxilina y Eosina.

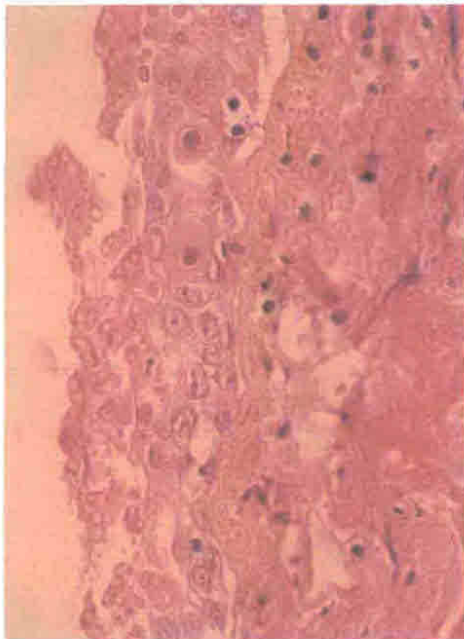


Hematoxilina y Eosina

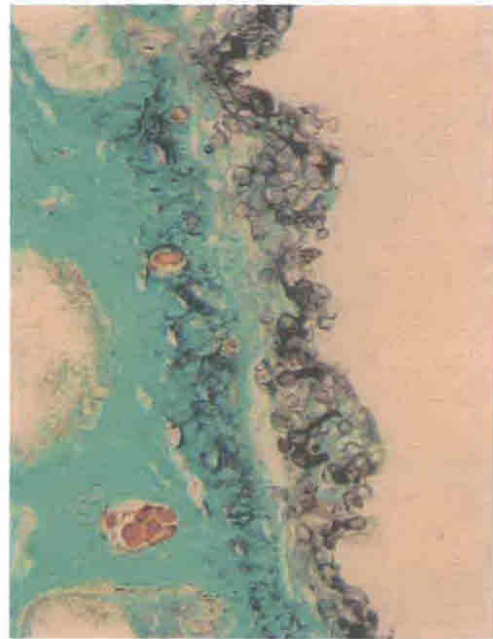


Metenamina de plata

Fotos de muestras histológicas en las que se observó más de 15 esporangios de *Batrachochytrium dendrobatidis* en un segmento de 0.5 mm de piel de *Atelopus varius* con Metenamina de Plata y Hematoxilina y Eosina.

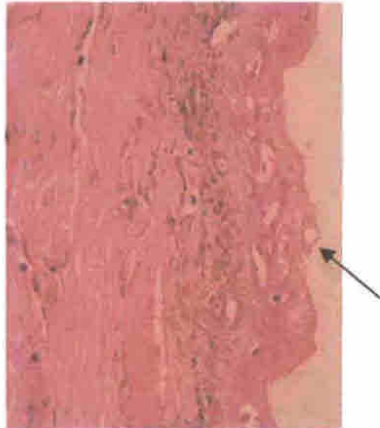


Hematoxilina y Eosina



Metenamina de plata

Esporangios de *Batrachochytrium dendrobatidis* con canal de expulsión vistas con ambas tinciones



Hematoxilia y Eosina

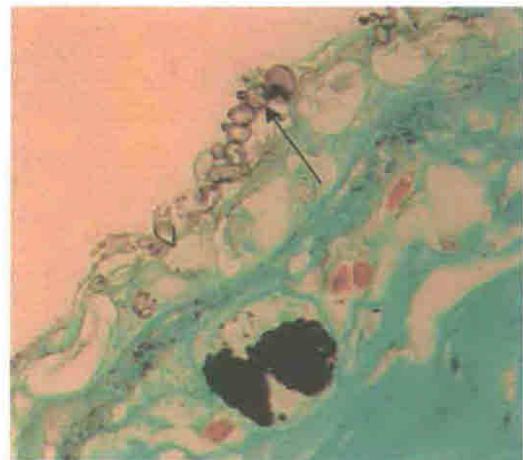


Metenamina de plata

Esporangios de *Batrachochytrium dendrobatidis* llenos de esporas



Hematoxilia y Eosina



Metenamina de plata

Corte transversal del IV dedo de *Atelopus varius* teñido con Hematoxilina y Eosina

